



ETSia

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica

Proceedings of the 4th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH



WIA:15



Universidad Politécnica de Cartagena

4th Workshop on Agri-food Research-WiA.15. Cartagena, Murcia, Spain. 11-12 May 2015

Proceedings of the 4th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH

Editores y Comité Científico Organizador

Dr. Francisco Artés-Hernández

Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Dr. Juan Antonio Fernández-Hernández

Dr. Alain Baille

Dr. Javier Calatrava

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

Doctorate Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) .

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

Acknowledgements

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

© 2016, Francisco Artés-Hernández, Marcos Egea Gutiérrez-Cortines, Juan Antonio Fernández-Hernández, Alain Baille , Javier Calatrava, (editores y comité organizador)

© 2016, Programa de doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. TAIDA, UPCT.

© 2016, Universidad Politécnica de Cartagena

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

Primera Edición, 2016

ISBN: 978-84-608-5399-2



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

Preface

As Convener of the Organizing and Scientific Committee of the 4th Workshop on Agri-Food Research (WIA.15) and Coordinator of the Doctoral Program in Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture (TAIDA), I am very pleased to see embodied in this book the excellent presentations conducted by PhD candidates of our Program. Presentations showed a great scientific interest and reflect the high potential of the Research Groups that belong to the several departments and institutions integrated into our PhD Program (UPCT, CEBAS-CSIC, and IMIDA). We expect that during the celebration of this Workshop, the coexistence and exchange of ideas and experiences among PhD candidates, research groups, researchers, technicians, etc.. has been favored.

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

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

Francisco Artés-Hernández PhD
Convener of the 4th Workshop on Agri-Food Research (WIA.15)

Index

Keynote speakers:

- **Research and development needs to reduce global food losses**
Dr. Jorge M. Fonseca 11
Agro-industry Official. Food and Agriculture Organization - FAO
(Rome, Italy).

- **The world 2.0 as an emergent tool for science dissemination**
Dr. José Manuel López Nicolás 12
Biochemistry and Molecular Biology department. University of
Murcia (Spain). In charge of the several times awarded "Scientia"
blog ('Bitácoras', '20 blog', 'ASEBIO', etc).

- **From hypothesis construction through experimental execution to
result publication and citation** 14
Dr. Mark D. Wilkinson
BBVA Chair of Biological Informatics. Distinguished researcher Isaac
Peral at Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP).
Universidad Politécnica de Madrid -INIA. Invited expert at W3C's
Semantic Web in Health Care and Life Sciences Interest Group and
member of the Editorial Board of the Journal of Biomedical
Semantics.

INDEX

ORAL SESSION I: Food Technology and Engineering	15
<i>Continuous microwave heating effects on the quality of carrot and tomato smoothie</i>	16
<i>M. Arjmandi, E. Aguayo, M. Otón, F. Artés</i>	
<i>Effect of isothermal and non-isothermal treatments on the viability and stress response of foodborne pathogen and spoilage microorganisms</i>	20
<i>J.P. Huertas, A. Esnoz, A. Palop</i>	
<i>Heat resistance of Listeria monocytogenes in sterile distilled water in the presence of nanoemulsion of D-limonene</i>	24
<i>J. Maté, P.M. Periago, A. Palop</i>	
<i>Innovative technology for industrial manufacturing of gluten-free pasta sheets</i>	27
<i>S. Soto, M. Boluda, A. López</i>	
<i>Effect of application of elicitors on the yield and quality of tomato</i>	31
<i>V. Hernández, P. Hellín, J. Fenoll, M.P. Flores</i>	
<i>Water stress to enhance vitamin C in extra early nectarines</i>	35
<i>N. Falagán, F. Artés, P.A. Gómez, F. Artés-Hernández, J.M. de la Rosa, E. Aguayo</i>	
<i>Phytosteranes determination in almonds depending on the cultivar and growing conditions (conventional versus ecological)</i>	39
<i>A.M. Carrasco del Amor, A. Gil Izquierdo, E. Aguayo</i>	
<i>Epiphytic microbial load changes of natural purple fresh vegetables smoothies during shelf life</i>	43
<i>G. González-Tejedor, F. Artés-Hernández, P.S. Fernández</i>	
<i>Effect of high pressure homogenization against pasteurization on a nutraceutical product with a high 10-hydroxy-2-trans-decenoic acid content and vitamin C</i>	47
<i>A. García-González, P.A. Gómez, E. Aguayo</i>	
<i>Optimization of chlorine sanitation to preserve quality of minimally processed Vicia faba seeds</i>	51
<i>M. Otón, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
<i>Discrimination of volatile compounds at harvest in melon identified by SPME and GC-MS</i>	55
<i>L.A. Chaparro-Torres, J.P. Fernández-Trujillo</i>	
<i>Sodium acidified chlorite and ozonated water as alternative sanitizing techniques for minimally processed broccoli</i>	59
<i>J. Navarro-Rico, G.B. Martínez-Hernández, P. Gómez, F. Artés, F. Artés-Hernández</i>	
ORAL SESSION II: Agrifood Biotechnology	63
<i>"Itumthirteen" & "Itumfourteen": a bet on the Muscat grape flavor</i>	64
<i>M. Torne, J. Carreño</i>	
<i>Identification of DNA from Antirrhinum linkianum introgressed in A. majus with common molecular markers</i>	68
<i>V. Ruiz-Hernández, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
<i>MISTRAL 30[®], new platerine obtained from IMIDA-NOVAMED breeding program</i>	71
<i>A. Carrillo-Navarro, A. Guevara-Gázquez, J. Cos-Terrer</i>	
<i>Expression patterns of antioxidant systems in pioneer plants present in mine tailings contaminated with high concentrations of heavy metals</i>	74
<i>A. López-Orenes, H. Oliveira, C. Santos, M.A. Ferrer, A.A. Calderón</i>	
<i>Genetic analysis of traits of interest in wine grapes</i>	78
<i>A. Bayo-Canha, J.I. Fernández-Fernández, A. Martínez-Cutillas, L. Ruiz-García</i>	
<i>Estimates of heritabilities and genetic correlations of carcass quality traits in a reared gilthead seabream (Sparus aurata L.) population sourced from three broodstocks</i>	82
<i>M. García-Celdrán, G. Ramis, E. Armero</i>	

Sweet cherry behaviour in the climatic conditions of the Region of Murcia	86
<i>G. López-Ortega, F. García, C. Frutos, A. Bayo-Canha, D. Frutos</i>	
Using 23S rDNA to identify contaminations of <i>Escherichia coli</i> in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cultures	90
<i>M. Manchado-Rojo, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
Differential growth of the main parts of the carcass rabbit	93
<i>A. Martínez-Bas, E. Armero, M. Kessler</i>	
Trailing plants, identification of T-DNA mutants and introgressions of <i>Antirrhinum linkianum</i> in <i>A. majus</i>	97
<i>R. Alcántud, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
Effect of concentration of IBA during rooting phase in vitro of <i>Limonium sinuatum</i> on the survival and quality of the plant	99
<i>J. Sánchez, A.A. Calderón</i>	
Quantitative evaluation of bias in PCR amplification and Next Generation Sequencing derived from metabarcoding samples	103
<i>M. Pawluczyk, J. Weiss, M.G. Links, M.E. Aranguren, M.D. Wilkinson, M. Egea-Cortines</i>	
ORAL SESSION III: Vegetal Production Technology and Engineering	107
Influence of <i>Phragmites australis</i> on the seasonal evolution of biogeochemical conditions (pH/Eh) and N cycling in eutrophic wetlands	108
<i>M.C. Tercero-Gómez, J. Álvarez-Rogel, M.I. Arce, M.J. Delgado, H.M. Conesa, I. Párraga-Aguado, M.N. González-Alcaraz</i>	
Evolution of <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance to diamide insecticides over the last 5 years	112
<i>L. García-Vidal, M.R. Martínez-Aquirre, P. Bielza</i>	
Genetic variability of tolerance to spinosad and emamectin benzoate in different Mediterranean populations of <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)	116
<i>V. Balanza, J.E. Mendoza, P. Bielza</i>	
Cold-tolerance variability in different Mediterranean populations of <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)	120
<i>J. E. Mendoza, V. Balanza, M. Garre-Carrasco, P. Bielza</i>	
Agronomic effects of three cultivation techniques (conventional, integrated and organic) on yield of sweet pepper under greenhouse cultivation	124
<i>J. Navarro Sánchez, F.M. del Amor Saavedra, J. Cánovas Cuenca</i>	
Study of the susceptibility of <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae) to two diamides	128
<i>M.R. Martínez-Aquirre, L. García-Vidal, P. Bielza</i>	
Houses for workers at mines in Cartagena-La Unión	132
<i>M. Ortega, J. Calvo</i>	
Seed dormancy break and germination of southeast Iberian endemic <i>Narcissus tortifolius</i>	136
<i>E. Martínez-Díaz, J.J. Martínez-Sánchez, M.J. Vicente Colome</i>	
Effect of maternal environmental factors on seed dormancy of <i>Astragalus nitidiflorus</i>	140
<i>F. Segura, M.J. Vicente, J.A. Franco, J.J. Martínez-Sánchez</i>	
Current status of insecticide resistance in <i>Myzus persicae</i> in Spain.	144
<i>A. Belando, I. Moreno, P. Bielza</i>	
Interaction between ABA and cytokinins in salinized tomato plants	148
<i>A. Martínez-Pérez, G. Bahar Oztekin, A. Albacete, A.J. Thompson, M.P. Sánchez-Iglesias, F. Pérez-Alfocea C. Martínez-Andújar</i>	
Acquired resistance by <i>Bemisia tabaci</i> to different insecticides in laboratory conditions	156
<i>I. Moreno, A. Belando, P. Bielza</i>	

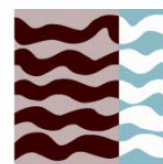
<i>Preliminary study of the palliative effect that offers grafting in plants of sweet pepper against to water stress</i>	156
<i>A. Gálvez López, J. López-Marín</i>	
<i>Towards a more sustainable fertilization: combined use of compost and inorganic fertilization for tomato cultivation</i>	160
<i>C. Chocano, T. Hernández</i>	
<i>Long-term impact of deficit irrigation on the physical quality of berries in 'Crimson Seedless' table grapes</i>	164
<i>M.R. Conesa, J. M. de la Rosa, F. Artés-Hernández, I. C. Dodd, R. Domingo, A. Pérez-Pastor</i>	
<i>Landscaping criteria in Assets of Cultural Interest: Antigones Barracks in Cartagena</i>	168
<i>M.A. Guillén Pérez, J.A. Franco, J. Ochoa</i>	
<i>Suitability of using trunk diameter fluctuations for irrigation management in sub-surface drip irrigation in lemon trees</i>	172
<i>J.M. Robles, P. Botía, J.G. Pérez</i>	
<i>Ruiz Hidalgo Park in Murcia (1908-1955)</i>	176
<i>F. Medina, S. Bañón, J. Ochoa</i>	
<i>The inorganic part of green roof substrates impacts differently on the growth of two Mediterranean plant species</i>	180
<i>S. Ondoño, J.J. Martínez-Sánchez, J.L. Moreno</i>	
<i>Irrigation scheduling and regulated deficit irrigation in stone fruits</i>	184
<i>F. Pérez-Sarmiento, O. Mounzer, E. Nicolás</i>	
<i>Waste management and contaminated soil from metal mining: technical aspects, environmental and regulatory framework</i>	188
<i>M.G. Rosique López, G. García-Fernández</i>	
<i>Effect of genetic background on resistance to <i>Meloidogyne incognita</i> in pepper</i>	192
<i>F. Sánchez-Solana, C. Ros, C.M. Lacasa, M.C. Martínez, A. Lacasa</i>	
<i>Feasibility of using of the maximum daily trunk shrinkage and stem water potential reference lines for irrigation scheduling of early nectarine tree</i>	196
<i>J.M. de la Rosa, M.R. Conesa, R. Domingo, A. Pérez-Pastor</i>	
ORAL SESSION IV: Agroforestry Engineering	200
<i>Calculation of biophysical indicators through the automatic processing of satellite images</i>	201
<i>J.M. Erena Arrabal, D. Sánchez, J. Pecci, G. Lendrino, Z. Hernández, S. García</i>	
<i>Probabilistic assessment of the influence of metrics and RCMs combination on rainfall projections in Spain</i>	205
<i>P. Olmos, S. García, J.D. Giraldo</i>	
<i>Evapotranspiration estimates from vegetation indices</i>	209
<i>J. A. Martínez, S. Garcia, A. Baille</i>	
<i>Water balance estimation of the Campo de Cartagena watershed using hydrological modeling and remote sensing</i>	213
<i>J.E. Hunink, S. Contreras, A. Baille</i>	
<i>Cloud computing management in lysimetric stations with automatic supervision of digital images</i>	216
<i>J.M. González-Esquiva, J.A. Vera-Repullo, L. Ruiz-Peñalver, M. Jiménez-Buendía, J.M. Molina-Martínez</i>	
<i>Sustainable management assessment of a historical urban green space through the ecosystem services provided: Contingent Valuation Method</i>	220
<i>S. Gómez, F.J. Alcón</i>	
<i>Competitiveness of palm dates fruit of Tunisia in the Mediterranean region</i>	224
<i>R. Ben-Amor, E. Aguayo, M.D. de Miguel-Gómez</i>	

Poster Session: Food Technology and Engineering	228
<i>Effects of heat treatments in combination with high hydrostatic pressures (HHP) on the viability and physiological state of Clostridium species</i>	229
<i>I. Gómez-Jódar, A. Palop</i>	
<i>Association among aroma volatiles and other traits in near-isogenic lines with firm flesh texture</i>	233
<i>M. Zarid, J.P. Fernández-Trujillo</i>	
<i>Development of innovative food with high nutritional value from native legumes</i>	236
<i>E. Collado, E. Armero, P.A. Gómez</i>	
<i>Abiotic stress combination to improve healthiness of fresh vegetables smoothies</i>	239
<i>A.C. Formica, G.B. Martínez-Hernández, F. Artés-Hernández</i>	
<i>Changes in the phenylpropanoid metabolism induced by Nacobbus aberrans in chilli pepper CM334 resistant to Phytophthora capsici</i>	243
<i>N. López-Martínez, J.P. Fernández-Trujillo, M. Biesaga, E. Zavaleta-Mejía</i>	
Poster Session: Agrifood Biotechnology	246
<i>Genetic analysis of the Antirrhinum majus circadian clock</i>	247
<i>M.L. Terry, J. Weiss, M. Egea-Cortines</i>	
Poster Session: Vegetal Production Technology and Engineering	251
<i>Impact of production system on development of insecticide resistance in Frankliniella occidentalis (Thysanoptera: Thripidae)</i>	252
<i>J. Abellán, V. Quinto, C. Grávalos, E. Fernández, P. Bielza</i>	
<i>New strategies for controlling the development of Penicillium digitatum and P. italicum in lemon (Citrus limon (L.) Burm.), based on the induction of its natural defenses</i>	256
<i>M.A. Parra, J.A. Martínez</i>	
<i>Protocols for feasibility study of using saline reclaimed water combined with deficit irrigation strategies in citrus</i>	260
<i>C. Romero-Triqueros, P.A. Nortes, E. Nicolás</i>	
Poster Session: Agroforestry Engineering	264
<i>Subsurface drip irrigation vs. surface drip irrigation in tomato</i>	265
<i>F.J. Lucas, V. Martínez-Álvarez, M. Valiente</i>	

Organizers



Universidad
Politécnica
de Cartagena



ETSIA
Escuela Técnica
Superior de
Ingeniería
Agronómica

Collaborators





Keynote speakers

Research and development needs to reduce global food losses

J.M. Fonseca

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italy.

Abstract

This presentation highlights some significant gaps of knowledge needed to reduce food losses and waste and provides an overall analysis of bottlenecks to the implementation of measures across the globe. It is recognized that food losses is not new for the modern society. However, given the low impact of some efforts to reduce losses during the last decades, the persistent global hunger and the known implications of food production on the Earth' sustainability a true macro change is warranted. FAO's estimation for global food losses and waste based on a 2011 study are currently further analyzed through field case studies in different developing countries, and nevertheless showing unreasonable high numbers of both quantitative and qualitative losses. Causes of food losses are briefly discussed. While technology and infrastructure continue to be a justifiable target for research and innovation the author emphasizes on the need for conducting research that links different agriculture/food disciplines as to aim at providing more holistic solutions. Innovative interventions that are friendly with the environment and promote healthy socio economics are in demand. Directing research toward developing markets for "forgotten" local varieties and food crops is presented as one way to add to the reduction of food losses, and to food security and nutrition as a whole.

Keywords: food security; local production; nutrition

The world 2.0 as an emergent tool for science dissemination

J.M. López-Nicolás

Biochemistry and Molecular Biology department.. Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo- 30100. Murcia, Spain.

Abstract

Something is changing as much in the world of popular science as the dissemination. A few years ago, scientist articles were published only for other researchers in journals. However nowadays, the researcher's pressure, the popular science blogs and the social network use have helped with the access, compression, and dissemination of these papers. In fact, although many researchers do not see the high importance of popular science to the science development, his strong has got Spanish government include this in the law <<De la ciencia, la tecnología y la Innovación>> taking a close view at relationships and speaking between science, technology, innovation and society.

For these reasons, popular science blogs are basic support tool to popularization of science as of today. Furthermore, it has produced an incredible increase of personal and collective blogs to disseminate the whole science knowledge.

There is a particular case of popular science blog, those whose author is a professor, combining his research and teach work, with popularization of science.

Inside of the advantages of professor blogs we can emphasise the repercussion to the institution or him own. First, it is well known that the Spanish university is going through difficult times. Our delicate economical situation is decreasing incredibly the science and education investment causing the getting down of the quality parameters of our institutions. Nevertheless, a bit group of Universities have decided to support popular science without a doubt getting an important position in the university world.

In addition, the university research/popularizer with a blog can get a feed back of its. On the one hand, the business profiles in social network that the popularizer use can be a new way to contact with then easier than another "official ways". Thanks of it, there are some cases where the researchers manage to disseminate and popularize their results between businesses of their interest. A big number of partnership agreements have been signed thanks to the popularization of science in blogs, which would have been difficult to sign without the use of these communication channels.

On the other hand, there are many researchers that popularize his research using different strategies to attract non-specialized public. As for now, the use of science fiction, humour, or fantastic cinema are getting importance to popularize science in blog, later to the publication in a specific journal with a good impact factor. Comic characters, Superheroes, or The Lord of the Rings characters have been used by university popularizer of science to explain knowledge of physics, biochemistry or molecular encapsulation. This type of popularization, which for some purists is a frivolity, is revolutionizing the scientific world because not only has got to increase the public updated in new science, in addition, this type of divulgation has allowed partnership agreements between researchers of different groups and topic.

However, not all that glitters is gold in popular science inside university blogs, there a many problems that a professor have to pass to popularize science. First, his decision to disseminate his own results and the result of other researchers using a blog is not accepted by university community. In my opinion, this fact is sometimes caused by the ignorance of the utility of blogs and social network, it may change urgently. Another problem is the almost total thought of not recognizing academically this work. Although the new

Science Law consider the popularization of science, this labour are not included in CVs scales dated today so, many university popularizers are thinking to continue or not, with popular science.

To finish: Last years the work of a researcher has been focused on study a topic, to formulate an hypothesis about it, to design and to make experiments to confirm or not the hypothesis, to write the results and to publish them in a journal. When it had been completed, he started again. However, is the time to include a new element permanently: to disseminate this knowledge to the society in a way that they can understand and their future applications. Popular science blogs are a powerful tool to obtain it and the new Ley <<De la ciencia, la tecnología y la Innovación>>, if it is correctly applied, it will the ideal guide to consolidate the popular science.

Keywords: science blogs; social network; knowledge.

From hypothesis construction, through experimental execution, to result publication and citation

M.D. Wilkinson

Distinguished researcher Isaac Peral at Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP).
Universidad Politécnica de Madrid –INIA, Madrid, Spain.

Abstract

Biomedical science is suffering a “crisis”, with some meta-analyses now suggesting upwards of 60-70% of peer-reviewed and published studies are non-reproducible. The reasons for this non-reproducibility vary – from simple lack of knowledge regarding proper analytical or statistical techniques, to outright academic misconduct. What is important to note, however, is that the scientific process appears to be failing at all levels, and at all “checkpoints”, particularly in the “big data” era. Researchers generally do not adequately describe what they did during a study; if they make an error, they are generally unaware of that error; peer-reviewers do not (and often cannot) notice the errors; publishers do not enforce current best-practices in the description of scientific methodology or data derivation; journal retraction is a very rare occurrence; and finally, the flawed data is absorbed into our public repositories, and thus contaminates the work of other researchers in the future. In this presentation I will discuss existing and emergent Web-embedded technologies and best-practices that aim to improve the way we conduct scientific investigation, publication, citation, and re-use of data and knowledge.

Keywords: Semantic Web; Scientific Reproducibility; workflows; web services.



ORAL SESSION I
Food Technology and
Engineering

Continuous microwave heating effects on quality of carrot and tomato smoothie

M. Arimandi^(1,2), E. Aguayo^(2,3), M. Otón⁽³⁾, F. Artés^(2,3)

⁽¹⁾ College of Agriculture & Natural Resource. University of Tehran. Karaj. Iran. E-mail: mitra.arjmandi@ut.ac.ir

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

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

Abstract

The effect of conventional and microwave pasteurization on the lycopene and β -carotene content and on the physicochemical quality attributes (TSS, pH, TA and color) of pasteurized orange smoothie were evaluated. The smoothie was elaborated with tomato, carrot, pumpkin, lemon juice, mineral water and marine salt. The conventional pasteurization (CP) was made by mean of a semi-industrial thermomix, while for microwave pasteurization (MWP) an innovative semi-industrial continuous microwave oven was used. After both pasteurization methods no significant changes in TSS, pH and TA were found while the carotenoids content was enhanced. MWP provided the highest lycopene and β -carotene content, showing MW equipment as a tool to pasteurize and improve the bioavailability of carotenoids of the smoothie.

Keywords: Pasteurization; quality attributes; carotenoids.

1. Introduction

Fruits and vegetables contain large amounts of antioxidants interesting for the human diet, including carotenoids, vitamins, flavonoids, other phenolic compounds, glutathione, and endogenous metabolites [1, 2]. Smoothies are an increasingly popular way of consuming fruits and vegetables. Traditionally, smoothies consist of a number of ingredients including fruit, vegetables, fruit juice and ice. Smoothies are often thermally processed which has been shown to affect the carotenoids and color of foods [3]. Color is the most important quality attributes of juice and smoothie that influence the consumer's choice and a number of studies have shown that thermal processing has a marked impact on the color of products [4]. Regarding food quality and safety some of these changes are undesirable and must be minimized. Nowadays, the purpose of thermal processing is to extend the shelf-life of products without lowering the quality attributes and safety. On the other hand an emergent method for pasteurization of the smoothies and juices using the energy of microwaves (MW) has been developed. This technique might be useful in retaining the nutritional quality of foods after processing, especially in these such as smoothies which contain a high quantity of carotenoids. The MW processing offers many advantages over conventional techniques being particularly useful for homogeneous products, such as smoothies. It

has been shown that food processed in this way maintains its original freshness, flavor, and taste, while color changes are minimal [3]. Despite alternations to the structure of high-molecular-weight molecules such as proteins and carbohydrates, MW is unable to affect smaller molecules associated with the sensory, nutritional and health promoting properties such as volatile compounds, pigments, and vitamins.

The aim of this study was to investigate the changes in carotenoids and color in orange smoothies heat treated under conventional and MW pasteurization.

2. Materials and Methods

2.1. Sample preparation

After several preliminary tests the smoothie has been designed and prepared including tomato (126 g), carrot (61 g), pumpkin (29 g), lemon juice (4 mL, to reach a pH of 4.5), mineral water (50 mL) and 0.3 g marine salt. The ingredients were blended for 3 min in a semi-industrial thermomix (Vorwerk elektrowerke, Model TM 31-1, France) with speed 8. Fresh control smoothies were chilled (5°C) immediately after blending.

2.2 Treatments

MW pasteurization (MWP): An innovative semi-industrial prototype of continuous MW oven (MWO, Sairem Ibérica S.L. SI-MAQ0101, Barcelona, Spain) has been installed and tuned to

carry out the current experiments. The continuous-flow system of the MWO includes a feed belt with a move back and forth process, an optimized heating chamber, high efficient energy economizing filters, a computer interface and a fiber optic slip ring for online temperature measurements. Based on our preliminary studies several appropriate temperature/time combinations of MW treatment were selected. To obtain MW pasteurized sample, 600 mL of sterile smoothie were heated in glass containers. The glasses were placed in the feed system of the MWO and treated on high power/short time (1600 and 3600 W for 206 and 93 s) and low power/long time (210 and 260 W for 646 and 608 s) conditions.

Conventional pasteurization (CP): Samples were heated in the semi-industrial thermomix above described at 90°C for 35 s. For each cycle about 600 mL of each smoothie were prepared. After both kind of pasteurization, the samples were rapidly cooled down (0°C) into a water-ice bath, packaged into the plastic tubes and then stored at 5°C to be freshly analyzed. Three treatment series were performed for each heating method. Finally, samples were evaluated for each treatment.

2.3. Chemical and Physical Analysis

The analysis were carried out before (control) and after MW treatment. For each treatment and evaluation period, three replicates were analyzed.

2.3.1. Color measurement

The color of samples was determined with a colorimeter (Minolta CR-300, Ramsey, NJ, USA) in triplicate. The equipment was calibrated using a standard white reflector plate. Readings were obtained using the standard CIE (Committee International d'Eclairage) L* (lightness), a* (redness) and b* (yellowness). The results were expressed as L* and hue angle ($h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$).

2.3.2. Measurement of soluble solids content (SSC), pH and total titratable acidity (TA)

Soluble solids content of smoothies were determined using a digital refractometer (Atago, Tokyo, Japan) and expressed as °Brix. Samples pH was measured with a pH meter (Crison 2001 pH meter, Instruments SA, Barcelona, Spain) calibrated with phosphate buffers of pH 4 and 7. Titratable acidity was calculated by titrating 5 mL of homogenized smoothie sample with 0.1 N NaOH to an end point of pH 8.1 (716 DMS Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland [5]).

2.3.3. Carotenoids

Carotenoids were spectrophotometrically monitored according to Nagata and Yamashita (1992) [6] with slight modifications. 5 mL of smoothie were mixed with 20 mL acetone-hexane (4:6). After passing a few minutes, two phases separated and upper layer was taken for lycopene and β-carotene measurements at 663, 645, 505 and 453 nm in a UV-visible spectrophotometer (Hewlet Packard, Model: 8453, Columbia, EEUU). Lycopene and β-carotene in acetone-hexane extracts were calculated according to the following equations:

$$\text{Lycopene (mg/ 100 mL)} = -0.0458 A_{663} + 0.204 A_{645} + 0.372 A_{505} - 0.0806 A_{453}$$

$$\beta\text{-carotene (mg/ 100 mL)} = 0.216 A_{663} - 1.22 A_{654} - 0.304 A_{505} + 0.452 A_{453}$$

The analysis was carried out before and after each pasteurization treatment. All analyses were made by triplicate and results were expressed as mg L⁻¹ of smoothie.

2.3.4. Statistical Analysis

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

3. Results and Discussion

3.1. Measurement of soluble solids content (SSC), pH and total titratable acidity (TA)

SSC in unheated smoothie was 5.10 °Brix and this value slightly increased after both thermal treatments. No significant differences by the type of thermal treatment were found. Initial pH value (4.50) was not significantly affected by treatments. There were no differences among the TA stability of the different treated samples, with 0.46% and 0.44% citric acid in unheated and MWP samples, respectively.

3.1. Color

The effects of MW and CP on L* and h° of smoothie are illustrated in Fig. 1 and 2. L* values increased after all treatments. MW treated samples for all doses showed higher L* values than in CP and in untreated smoothies (p<0.05). These results showed the MWP smoothies suffered a little change in luminosity. Commonly, MW treatments have been reported as a technique for better preserving the color in juices and smoothies compared to CP [7].

3.1 Carotenoids

Lycopene is an important intermediate in the biosynthesis of many carotenoids, including β-carotene, responsible for yellow, orange or red

pigmentation, photosynthesis, and photo-protection [8]. According to results displayed in Fig. 3, the lycopene value significantly increased by different thermal treatment methods. The initial lycopene content in fresh smoothie was $10.56 \pm 0.06 \text{ mg L}^{-1}$, whereas this amount increased significantly ($p < 0.05$) after all heat treatment and reached to the maximum amount ($12.93 \pm 0.09 \text{ mg L}^{-1}$) in MW treatment. The results are supported by other study [9], which demonstrates thermal processing enhanced the nutritional value of tomatoes by increasing the lycopene content. Heating processing leads to extraction of lycopene from the matrix by breaking down cell walls, therefore making lycopene more accessible.

The β -carotene content was enhanced after heat treatment by both methods, but there were no significant differences among the type of treatment. The initial amount of β -carotene in unheated smoothie was $5.89 \pm 0.07 \text{ mg L}^{-1}$, which increased by heat treatment and achieved the maximum value in combination of highest power and short duration in continuous MW ($6.88 \pm 0.09 \text{ mg L}^{-1}$). The results were confirmed by other authors [8, 9, 10] who reported heating treatment enhanced lycopene and β carotene in cooked tomato, carrot, spinach and pumpkin compare to the fresh product. In general, heating of vegetables resulted in break down of the cellulose structure of the plant cell and thus improves the bioavailability of carotenoids [11].

4. Conclusion

The use of MWP provide a fast heating of smoothie, useful for improving the initial carotenoids content. Its application in a continuous way with the equipment used in the current work was efficacy enough when compared to the CP method.

5. Acknowledgements

Thanks are due to Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV-UPCT) for providing MW equipment. This work was financially supported by Spanish Ministry of Economy and competitiveness MINECO (AGL2013-48830-C2-1-R) and FEDER.

6. References

- [1] Francis F.J. 1995. Quality as influenced by color. *Food Quality and Pref.* 6(3): 149–155.
- [2] Martínez-Hernández G.B., Artés-Hernández F., Gómez P., Artés F. 2013. Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *J. Funct Foods.* 5: 133–143.
- [3] Keenan D.F., Brunton N.P., Gormley T.R, Butler F., Tiwari B.K., Patras A.. 2010. Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and color of fruit smoothies. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 11: 551–556.
- [4] Butz P., Tauscher B. 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research Int.* 35(2–3), 279–284.
- [5] Aguayo E., Escalona V.H., Artés F. 2007. Quality of minimally fresh processed *Cucumis melo* var. *saccharinus* as improved by controlled atmosphere. *J. Europ. Hort. Sci.* 380 72: 39–45.
- [6] Nagata M., Yamashita I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.* 39: 926-928.
- [7] Patras A., Brunton N., DaPieve S., Butler F., Downey G. 2009. Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental color of tomato and carrot purées. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 10(1): 16–22.
- [8] Quartey E.K., Amoatey H.M., Achel D.G., Klu G.Y.P., Mba R.A. 2012. Induced mutations for improved lycopene, total antioxidant properties and other quality factors in wild tomato (*Solanum pimpinellifolium* L.). *J. Food Sci. Technol.* 4(4): 182-188.
- [9] Rock C.L., Loalvo J.L., Emenhise C., Ruffin M.T., Flatt S.W., Schwartz S.J. 1998. Bioavailability of β -carotene is lower in raw rather than in processed carrots and spinach in women. *J. Nutr.* 128: 913–916.
- [10] Stahl W., Sies H. 1992. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J. Nutr.* 122: 2161–2166.
- [11] Azizah A.H., Wee K.C., Azizah O., Azizah M. 2009. Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). *Int. Food Res. J.* 16: 45-51.

Figures

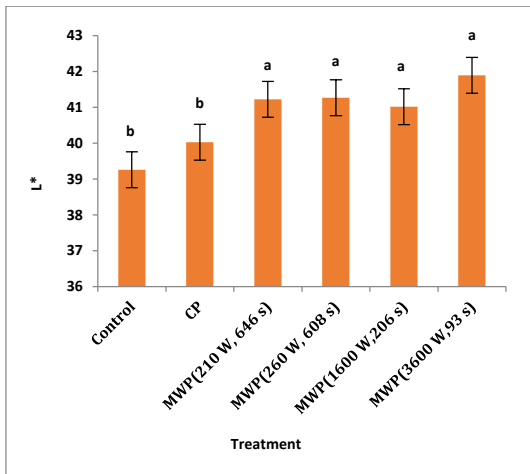


Figure 1. Effect of different microwave doses (MWP) and conventional pasteurization (CP) treatments on L* of smoothie (mean ± SE, n=3).

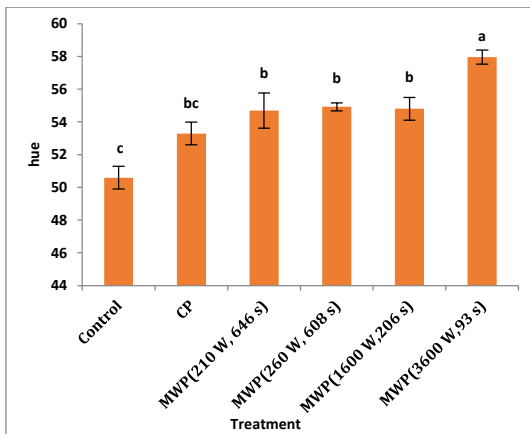


Figure 2. Effect of different microwave doses

(MWP) and conventional pasteurization (CP) treatments on hue angle smoothie (mean ± SE, n=3).

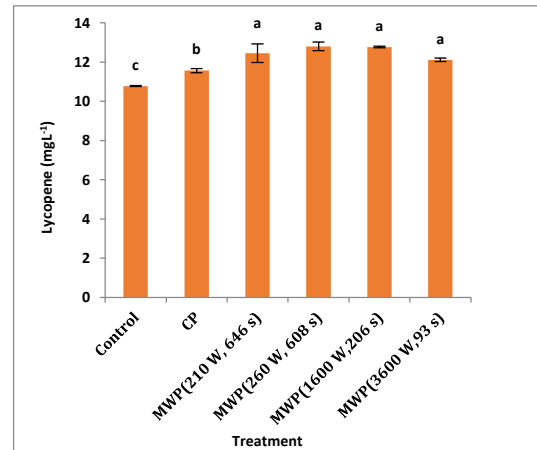


Figure 3. Effect of different microwave doses (MWP) and conventional pasteurization (CP) treatments on the value of lycopene (mg L⁻¹) smoothie (mean ± SE, n=3).

Effect of isothermal and non-isothermal treatments on the viability and stress response of foodborne pathogen and spoilage microorganisms

J.P. Huertas, A. Esnoz, A. Palop

Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, España. jphb@alu.upct.es

Resumen

Los tratamientos térmicos son el proceso de conservación más ampliamente utilizado en la industria alimentaria. Podría decirse que casi todos los alimentos reciben, al menos, un tratamiento térmico durante su manufacturación. Los objetivos de este trabajo fueron determinar el comportamiento de los microorganismos en condiciones isotérmicas y anisotérmicas (tanto en estático como en continuo), determinar el uso correcto de la combinación de calor y antimicrobianos naturales (tecnología de barreras) y encontrar los genes involucrados en la respuesta a los tratamientos térmicos. El uso de la tecnología de barreras se basa en aplicarlas de forma correcta. En este estudio se encontró que aplicar los compuestos antimicrobianos durante el tratamiento térmico no tenía efecto sobre la inactivación del microorganismo, mientras que su aplicación después del mismo, resultó en una reducción significativa del tiempo de tratamiento. El intercambiador de calor usado en esta investigación permite determinar el comportamiento de los microorganismos de forma más real. Los resultados obtenidos muestran que un ligero incremento en la velocidad de calentamiento resulta en una mayor inactivación. La síntesis *de novo* de proteínas y el uso de la cisteína para la estabilización de las proteínas celulares son mecanismos clave en la termorresistencia de *C. sakazakii*.

Palabras clave: Resistencia al calor; Intercambiador de calor; Respuesta genética; Microbiología predictiva.

Abstract

Thermal treatments are the most widely preservation technique used in the food industry. Almost, all food products are heated at least once. The objectives of this study were to determine the behavior of microorganisms under isothermal and non-isothermal heat treatments, to determine the microbial inactivation during a continuous heating process, to find the best balanced application of heat and natural antimicrobials (hurdles), and to determine the genes that could be involved in heat resistance. The basis of the hurdle technology is its correct use in the accurate way. Results show that the application of the natural antimicrobials in the heating medium do not have effect in the inactivation of the microorganism, while its application just before the thermal treatment results in greater inactivation, leading to a reduction of the treatment time. Results on the heat exchanger show that under non-isothermal treatments, a slight increase in the heating rate results in greater inactivation of microorganisms at the end of the process. The *de novo* protein synthesis and cysteine uptake for protein stabilization are key process in the heat resistance of *C. sakazakii*.

Keywords: Heat resistance; heat exchanger; genetic response; predictive microbiology.

1. Introduction

Heat treatment is used to produce safe and shelf stable foods and to eliminate pathogenic microorganisms. It is important to ensure that the food is adequately heat treated and to reduce post-processing contamination. The two most important issues connected with thermal processing are food safety and food quality. There are many conflicts between safety and quality issues. For example, microbial inactivation and food safety is increased by more severe heating conditions, but product quality in general deteriorates [1].

Microbial heat resistance determination performed under isothermal treatments help to set thermal treatments according to the microbial load of the food product being processed. However, industrial thermal treatments involves three distinct stages: heating, holding and cooling, and all three stages may contribute to the microbial inactivation. However, procedures are needed to evaluate the behavior of the microorganisms under a complete (three stages) and during each stage individually [1].

It has been believed that microbial inactivation follows a linear relationship, between the

decimal logarithm of the number of surviving microorganisms and the treatment time at a given temperature, but in many cases the obtained survival curves from thermal treatments show a non-linear relationship. In this case, lineal models are no longer valid, and non-linear models, such as the one derived from the Weibull distribution, should be used. The advantage of the Weibull model is its simplicity, flexibility and its hardness, giving the possibility of modeling linear and non-linear survival curves,

Also it is important to determine the response of microorganisms to inactivation treatments. Heat and other lethal agents cause damage to macromolecular cell components; thus the main function of stress proteins is to repair or destroy these damaged components so they do not disrupt cellular metabolism [2]. The heat-shock response is characterized by the induction of a large set of proteins as a result of a rapid increase in the environmental temperature [3].

The demand by consumers for high quality foods having “fresh” or “natural” characteristics has led to the development of foods that are preserved using mild technologies. Since microbial growth may occur at refrigeration temperatures, additional barriers (hurdles) are required to control spoilage and pathogenic microorganisms. The hurdle technology is the use of combined preservation factors (i.e. temperature, water activity, pH) for gentle, but effective, preservation of a variety of foods. To assure the microbiological safety and stability of healthful foods, it is necessary to apply balanced hurdles, achieving a hostile environment to inhibit their growth, shorten their survival or kill them, while not damaging the product's sensory and nutritional properties [4].

The objectives of this study were i) to determine the behavior of microorganisms under isothermal and non-isothermal heat treatments, ii) to determine the microbial inactivation during a continuous heating process, iii) to found the best balanced application of hurdles (heat and natural antimicrobials) and iv) to determine the genes that could be involved in heat resistance.

2. Materials & Methods

2.1 Microorganisms and in batch thermal treatments

Alicyclobacillus acidoterrestris DSM 3922, *Cronobacter sakazakii* DPC 6529, *Staphylococcus aureus* CECT 86T and *Salmonella* Senftenberg

CECT 4565 were used in this study. In batch thermal treatments were carried out as described in [5] and [6].

2.2 Thermal treatments on a continuous heating system

Thermal treatments were carried out on a tubular heat exchanger. The description of the equipment and the methodology is described in [7].

2.3 Bacterial response to heat treatments

The methodology used for the determination of the genes involved in the heat resistance is described in [6].

2.4 Data analysis

Data analysis performed to the obtained results is described on [5], [6] and [7].

3. Results and Discussion

The combination of heat treatments and natural antimicrobials has been widely studied, and a synergistic effect on the control of pathogenic and spoilage microorganisms has been shown. The simple addition and combination of preservative factors (hurdles) may not lead to achieve proper food preservation. It is necessary to determine the best order of apply the hurdles, in order to assure food safety and stability. The addition of nisin and citral to the heating and recovery medium in combination with a mild thermal treatment (95°C) for control of *A. acidoterrestris* has been tested. Fig. 1 shows that the application of a thermal treatment at 95°C for 2.5 min, followed by the addition of nisin (0.3 mg L⁻¹) and citral (0.34 mM) could inhibit the germination or outgrowth of *A. acidoterrestris* spores, reducing the risk of spoilage by this microorganism. When nisin and citral were added to the heating medium no effect was found.

The right application of the hurdles is not the only parameter to be determined. Accurate calculation of thermal inactivation kinetics is very important to determine the treatment time and temperature to apply. The classic *D* values were used to determine the inactivation kinetics of *A. acidoterrestris* because it followed a linear relationship at all the temperatures tested (Fig. 1). On the other hand the inactivation kinetics of *C. sakazakii* did not show a linear relationship (Fig. 2). This microorganism presented a tailing phenomenon, so the classic *D* value is not accurate to describe its thermal resistance.

Similar results were found for *S. aureus* and *Salmonella* Senftenberg. Calculations of the thermal resistance for these microorganisms were done by applying the Weibull model. The use of this model resulted in a better calculation of the heat resistance under isothermal treatments, which is necessary in order to predict accurately the behavior of microorganisms under non-isothermal treatments.

Nowadays many products are processed in continuous heating systems due to their many advantages [1]. The most common methods used to determine the effect of non-isothermal treatments on the heat inactivation of the microorganisms use batch heating systems (*i.e.* thermoresistometer Mastia, open vials, capillary tubes) to mimic industrial continuous heat treatments. Some authors have used tubular heat exchangers, but these equipments just enable to measure temperature and take samples at the inlet and outlet of the process. These methods do not allow to know the temperature profile and the inactivation kinetics of the microorganisms during the process. Therefore the effect of the heating rates on microorganism inactivation, throughout a process on a continuous heating system, or the behavior of the microbial population inside the system is on a black-box [7]. The heat exchanger used in this investigation provides reliable information about the heating profile during the whole process, permitting to know the heating rate in each section of the equipment, as well as to take samples during the whole process, which enables to plot reliable survival curves. Fig. 3 shows the differences between the inactivation levels reached when using the thermoresistometer Mastia and the heat exchanger, for *S. aureus* and *S. Senftenberg*. For both microorganisms, lower levels of survivors were found at the end of the thermal treatment in the heat exchanger. The treatment temperature in the heat exchanger in some points was slightly higher than in the thermoresistometer, and this could lead to the higher inactivation in the heat exchanger than in the thermoresistometer.

Transposon mutagenesis allowed the identification of some of the molecular mechanisms involved in the response of *C. sakazakii* DPC6529 to heat stress. A transposon mutants library with a total of 2,400 mutants was screened. After a selection step, 28 mutants were found to show a significant decrease in heat resistance as compared to the wild type. These mutants were tested in the thermoresistometer,

and only two of them (mutants 7 and 10) showed a significantly higher sensitivity to heat, when compared to the wild type (Fig. 2). Disrupted genes identified for mutant 7 and 10 encoded the ribosome maturation protein RimP and outer membrane porin L (OmpL), respectively. Results suggest that *de novo* protein synthesis, and the uptake of cysteine for the formation of disulfide bonds in proteins for its stabilization, are key processes on heat resistance.

4. Conclusions

The use of the hurdle technology is not just based on the addition of the hurdles, but is based on how to add the hurdles to achieve the best effect on the product safety and preservation. As shown for *A. acidoterrestis*, the addition of nisin and citral after a thermal treatment, led to greater inactivation of the microorganism, enabling to reduce the exposure time to the treatment. It has been shown that the use of adequate models to describe the heat resistance of microorganisms leads to a proper calculation of the thermal treatments intended to be applied for food preservation, avoiding over or under processing of food products. The heat exchanger used in this investigation permit to better understand the inactivation kinetics of microorganisms under continuous heating process, allowing to determine the effect of industrial treatments under a more realistic scenario. The current study also shed a light in the molecular mechanisms involved in the cellular response of *C. sakazakii* to thermal treatments, suggesting that *de novo* protein synthesis and cysteine uptake for protein stabilization are key process in the heat resistance of this microorganism.

5. Acknowledgments

The financial support of this research was provided by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through Project AGL- 2010-19775. J.P Huertas is grateful to the Spanish Ministry of Science and Innovation for his fellowship (BES-2011-046580).

6. Bibliography

[1] Lewis M.J. 2006. Thermal processing. In: J.G Brennan (Ed.) Food Processing Hand Book. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.

[2] Yousef A.E., Courtney P.D. 2003. Basics of stress adaptations and implications in new-generation foods. In: A.E. Yousef & V.K. Juneja (Eds.) Microbial stress adaptation and food safety. Florida, CRC press.

[3] Rossen R., Ron E.Z. 2002. Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. Mass Spect. Rew, 244-265.

[4] Alakomi H., Skyttä E., Helander I., Ahvenainen R. 2002. The hurdle concept. In T. Ohlson & N. Bengtsson (Eds.), Minimal processing technologies in the food industry. Florida, CRC press.

[5] Huertas J.P., Esteban M.D., Antolinos V., Palop A. 2014. Combined effect of natural antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. Food Cont. 73-78.

[6] Huertas J.P., Álvarez-Ordóñez A., Morrissey R., Ros-Chumillas M., Esteban M.D., Maté J., Palop A. Hill C. 2015a. Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powered infant formula. Food Res. Int. 401-409.

[7] Huertas J.P., Ros-Chumillas M., Esteban M.D., Esnoz A., Palop A. 2015 b. Determination of thermal inactivation kinetics by the multipoint method in a pilot plant tubular heat exchanger. Food Bioprocess Tech. Doi: 10.1007/s11947-015-1525-9.

nisin + 0.69 mM citral (○), *1.5 mM nisin + 0.69 mM citral* (▲).

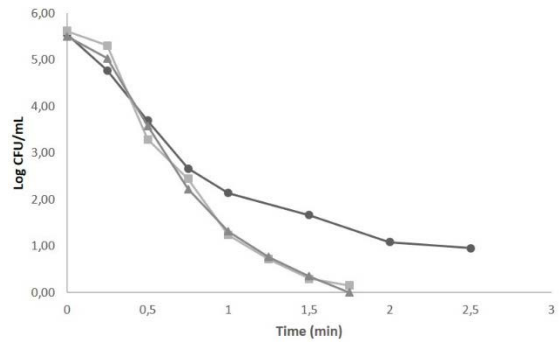


Figure 2. Thermal resistance of *C. sakazakii* DPC6529 (●), transposon mutant 7 (■) and transposon mutant 10 (▲) in an isothermal treatment at 58°C.

Figures

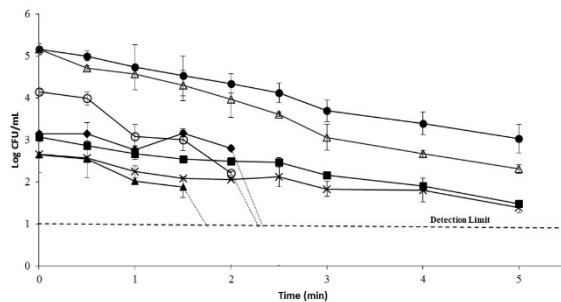


Figure 1. Survival curves of *A. acidoterrestris* with the antimicrobials in the recovery medium at 95°C in pH 3.5 McIlvaine buffer. Control (●), 0.3 mM nisin (■), 1.5 mM nisin (×), 0.69 mM Citral (Δ), 0.3 mM nisin + 0.34 mM citral (●), 0.3 mM nisin + 0.69 mM citral (○).

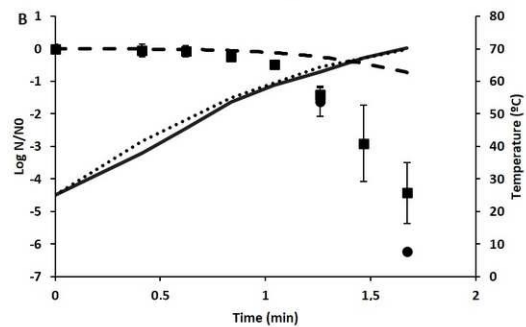
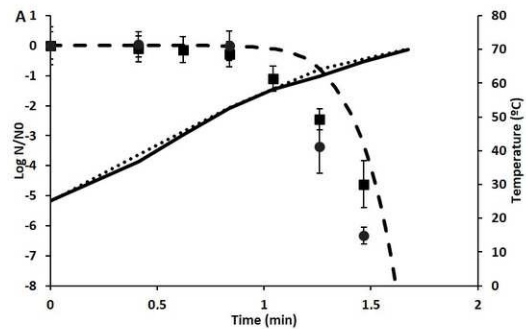


Figure 3. Survival curves of *S. aureus* (a) and *Salmonella seftenberg* (b) in the heat exchanger under a flow of 700 mL/min (●) together with the expected inactivation lines (dashed line) and the corresponding temperature profiles (dotted line) and in the thermoresistometer (■) mimicking heat exchanger heating profile (continuous line).

Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in sterile distilled water in the presence of nanoemulsion of *D*-limonene

J. Maté, P.M. Periago, A. Palop

Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain. j_ms_86@hotmail.com

Abstract

Nanoemulsions of oil essentials prevent microbial growth and even improving antimicrobial effect than when applied directly. Currently, there are no many studies where nanoemulsified essential oils have been combined with other factors of stress for the microorganism. This study demonstrates an interesting combined effect when applied heat and *D*-limonene nanoemulsion greatly reducing the value *D* significantly. These results could be of interest in the food industry to decrease thermal treatments and avoid the deterioration of the food due to the heat.

Keywords: Nanoemulsions, *D*-limonene, heat resistance, *Listeria monocytogenes*, antimicrobial effect.

1. Introduction

Listeria monocytogenes is a very ubiquitous microorganism, which is widely distributed in many environments, and can contaminate a wide variety of foods. Immunocompromised individuals, pregnant women and the elderly are those population groups most susceptible to this foodborne pathogen microorganism [1]. The ubiquity of this organism and its ability to grow in the form of biofilms enables it to be present in food processing plants and foods, being ready-to-eat foods those most likely to be contaminated [2].

One of the objectives of the present food industry is to provide consumers with better sensorial quality foods, while keeping food safety. One way to achieve this goal is to combine conventional thermal treatments with the use of natural antimicrobials. Among all of them, essential oils have gained special importance in recent years. Numerous studies have been developed evaluating the effect of the oils against a variety of microorganisms, but only a few documented studies have evaluated the combined effect of oils essentials nanoemulsions with other factors of stress for the microorganism. In 2014, Severino et al. [3] evaluated the antimicrobial effect of some essential oils with different combined non-thermal treatments (ozonized water, ultra violet-C light and gamma irradiation) against *L. monocytogenes*. Severino et al. [4] also studied the antimicrobial effect of an essential oil nanoemulsion combined with modified

atmosphere packaging and gamma irradiation against *E. coli* and *Salmonella*. In both cases, interesting results were obtained. So far, there are no documented studies that have tested the antimicrobial effect of a combination of antimicrobial nanoemulsions with heat treatments.

For this reason, the aim of this study was to evaluate the combined effect of a thermal treatment with a nanoemulsion of *D*-limonene on the inactivation of *L. monocytogenes* in sterile distilled water (SDW).

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains

Listeria monocytogenes CECT 4032 was used in this study and it was provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain). This strain was stored at -80°C (30% glycerol) until use. For growth and survival experiments, fresh cultures of *L. monocytogenes* were prepared by inoculating a loop of the cryopreserved culture in tryptic soy broth (TSB; Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) and incubating overnight at 37°C until the stationary growth phase was reached.

2.2 Antimicrobials

D-limonene was obtained from Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). For their direct addition to sterile distilled water, they were dissolved in ethanol (Panreac, Barcelona, Spain) at 95% (v/v). The working solution was prepared

to a final concentration of 1M and stored refrigerated until use.

2.3 Preparation of nanoemulsions

The nanoemulsions of *D*-limonene were prepared following the protocol described by Maté et al. [5] and based on catastrophic phase inversion (CPI) method [6].

2.4 Heat treatments

Thermal inactivation kinetics for *L. monocytogenes* in sterile distilled water supplemented with 0.5 mM *D*-limonene (direct addition or nanoemulsion) was determined at constant temperature (52.5°) in a thermoresistometer Mastia as described by Conesa et al. [7]. Surviving cells were enumerated in tryptic soy agar (TSA, Scharlau Chemie). Plates were incubated for 24 h at 37 °C. Each treatment was assayed by triplicate in independent experiments performed in different days.

2.5 Data analysis

Decimal reduction times (D-values) were calculated as the inverse negative of the slope of the regression line of the survival curves, drawn plotting the logarithm of the survivors versus the corresponding heating times. Survival curves included the average of the D values obtained for each experiment. D values are represented as mean and standard deviation (Excell 2010).

3. Results and discussion

When not antimicrobial was applied to the heating medium, *L. monocytogenes* $D_{52.5^\circ}$ value was 32.63 mins. In the case of the direct application of *D*-limonene, $D_{52.5^\circ}$ value was 22.58 mins. This date shows some additive effect by adding the antimicrobial directly to the heating medium. Finally, when the nanoemulsion of *D*-limonene was added to the heating medium, $D_{52.5^\circ}$ value was 0.31, this means it was about 100 times less than the control and 75 times less than when *d*-limonene was applied directly. This data shows that applying the *D*-limonene emulsified form, increases the antimicrobial effect of the same when combined with heat.

4. Conclusions

These findings reveal a striking made which could lead to important applications in the food industry. Some research had shown increased the efficiency of essential oils when they are

emulsified. But not many studies have combined this technology with other factors of stress for microorganisms. The possibility of decreasing heat treatment in the food industry, achieving the same levels of food safety, could be an important advance in food processing technology.

5. Acknowledgements

This research was made possible by financial support from the Ministry of science and innovation and FEDER through the AGL - 2010-19775 and AGL2013-48993-C2-1-R projects.

6. References

- [1] Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P. Bacteria: *Listeria monocytogenes*. Encyclopedia of Food Safety. 1: 450-461.
- [2] Pilchová T., Hernould M., Prévost H., Demnerová K., Pazlarová J., Tresse K. 2014. Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. Food Control 35: 366-372.
- [3] Severino R., Dang Vu K., Donsì F., Salmieri S., Ferrari G., Lacroix M. 2015. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. Food Control. 50: 215-222
- [4] Severino R., Dang Vu K., Donsì F., Salmieri S., Ferrari G., Lacroix M. 2015. Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. J. Food Eng. 124: 1-10.
- [5] Maté J.A., Periago P.M., Palop A. 2015. Combined effect of a nanoemulsion of *D*-limonene and nisin on *Listeria monocytogenes* growth and viability in culture media and foods. Food Sci. Technol. Int. DOI: 10.1177/1082013215577034
- [6] Zhang Z., Vriesekoop F., Yuan Q., Liang H. 2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of *D*-limonene and its nanoemulsion. Food Chem. 150: 307–312.
- [7] Conesa R., Andreu S., Fernández P.S., Esnoz A., Palop A. 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. J. Applied Microbiol. 107: 506-13.

Tables and figures

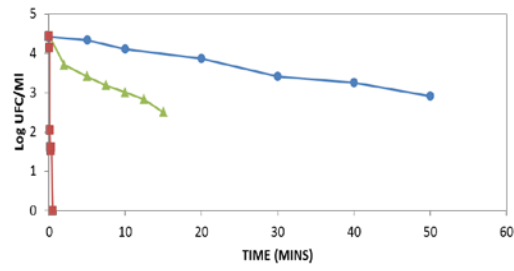


Figure 1. Survival curves of *Listeria monocytogenes* in SDW at 52.5°C. Control: ●; 0.5 mM D-limonene added directly: ▲; 0.5 mM D-limonene nanoemulsified: ■.

Table 1. D values (mean and standard deviation) of *Listeria monocytogenes* in SDW with 0.5 mM D-limonene added directly or nanoemulsified.

Heat Medium	Mean $D_{52.5^\circ}$ (min) \pm SD
TSB	32.63 \pm 1.07
TSB + 0.5 mM limonene (direct)	22.58 \pm 0.89
TSB + 0.5 mM limonene (nanoemulsified)	0.31 \pm 0.03

Innovative technology for industrial manufacturing of gluten-free pasta sheets

S. Soto-Jover, M. Boluda-Aguilar, A. López-Gómez

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

Resumen

La pasta se elabora de forma tradicional mediante harina de trigo, y tiene unas adecuadas características de textura que permite la fabricación industrial de pasta en hojas de grandes dimensiones (láminas con grosor de menos de 2 mm, con más de 5 m de largo, y más de 0.5 m de ancho). Esta elasticidad se debe principalmente al gluten contenido en la harina de trigo. La elaboración industrial de pasta sin gluten en hojas sigue siendo un reto tecnológico importante, ya que por no tener gluten se rompen con facilidad y son difíciles de manejar a escala industrial. En este trabajo se propone una composición y un procedimiento de elaboración de pastas sin gluten en hojas de gran tamaño que permite su fabricación industrial sin implicar grandes cambios en los procesos tradicionales de fabricación de este tipo de pastas a partir de harina de trigo. La formulación está compuesta por 40-50% de harina de arroz vaporizado; 0-20% de harina de maíz; 0.6-1% de sal; 30-40% de agua caliente, entre 90-100 °C; 0.1-0.5% de goma xantana; y 3.0-6.0% de albúmina. Mediante esta formulación se obtiene un incremento de la fuerza máxima biaxial de hasta un 159% y un incremento de hasta un 127% de la extensibilidad con respecto a las formulaciones establecidas en las patentes actuales para la elaboración de pasta sin gluten.

Palabras clave: comportamiento reológico; pasta de arroz vaporizado, extensibilidad; fuerza máxima biaxial

Abstract

The pasta, which traditionally is made with wheat flour, has suitable characteristics of texture and elasticity that allow the industrial manufacturing of pasta in large sheets. This elasticity is mainly due to gluten contained in wheat flour. The industrial manufacturing of gluten free pasta sheets is a major technological challenge. In this paper a composition and a method for making gluten free pasta in large sheets is proposed, for enabling its manufacture without involving important changes in industrial manufacturing processes of this type of pasta from wheat flour. The formulation is composed of 40-50% parboiled rice flour; 0-20% corn flour; 0.6-1% salt; 30-40% hot water, between 90-100 °C; 0.1 to 0.5% xanthan gum; and 3.0-6.0% of albumin. Using this formulation increased maximum biaxial force up to 159% and increased a 127% extensibility with regard to the formulations proposed by current patents for making gluten-free pasta.

Keywords: rheological behavior, parboiled rice pasta; extensibility; maximum biaxial force

1. Introducción

La pasta es un producto alimentario que se produce principalmente mediante la mezcla de sémola de trigo duro y agua. La masa así obtenida tiene unas adecuadas características de textura que permiten la fabricación industrial de pasta y su manipulación en hojas de grandes dimensiones (de menos de 2 mm de grosos y de más de 5 m de largo y 0.5 m de ancho) sin romperse, ya que tienen una gran resistencia a la tracción. Esta elasticidad se debe principalmente al gluten de la harina de trigo. De hecho, en el procesado de la pasta tradicional, el gluten es el principal responsable de la formación de la estructura y se considera el factor más significativo relacionado con la calidad de la pasta. El gluten se compone de gliadina y glutenina y es responsable de la elasticidad y la

masticabilidad al dente de la pasta, que es muy apreciada por los consumidores. Por ello, la pasta común fabricada con trigo tiene mejores parámetros de calidad (en cuanto a pérdidas por cocción, estructura, adhesividad, etc.) que la pasta elaborada con otros cereales sin gluten, como el arroz y el maíz [1]. Esta es la razón de que la elaboración industrial de determinados platos de pasta sin gluten en hojas siga siendo un reto tecnológico importante, que esta investigación ha tratado de resolver. El arroz crudo puede ser utilizado en la producción de pasta sin gluten, pero, como no tiene el gluten que actúa determinando el buen comportamiento viscoelástico de la masa, surgen problemas tecnológicos importantes que no permiten su fabricación a escala industrial [2]. Las láminas que se forman de pasta de arroz se quiebran con gran

facilidad. Con la tecnología actual no es posible fabricar industrialmente láminas de pasta de arroz de grandes dimensiones, como las indicadas anteriormente. De hecho, en la revisión bibliográfica correspondiente (incluyendo patentes) no se ha encontrado ninguna propuesta de formulación y procedimiento específico para la fabricación industrial de pasta sin gluten en hojas de gran tamaño, que permita la fabricación industrial de platos preparados a base de pasta sin gluten, como lasaña y canelones, para su comercialización refrigerada o como plato precocinado congelado, y que no implique grandes cambios e incrementos de costes respecto de los procesos que ahora se tienen a nivel industrial para la fabricación tradicional de pastas de trigo en hojas. Existía pues la necesidad de encontrar una composición y un procedimiento para la elaboración a nivel industrial de pastas sin gluten que solventara los problemas citados anteriormente.

Los estudios que se exponen en este artículo se encuentran recogidos en la Patente Española nº 2474920 [3], publicada por los autores de este trabajo. Esta tecnología tiene un gran interés ya que permite la elaboración industrial de pastas sin gluten en hojas, lo que puede reducir los costes y los precios de estos platos preparados de una manera muy significativa.

2. Materiales y Métodos

En este trabajo se estudian tres formulaciones de pasta sin gluten. Las Formulaciones 1 y 2 se han planteado para fabricar industrialmente hojas o láminas de pasta sin gluten, y son el resultado de un profundo estudio previo con diferentes ingredientes y técnicas de elaboración. La Formulación 3 se basa en las propuestas descritas en diferentes trabajos y patentes de pasta sin gluten [4-7], y se elabora con el objetivo de comparar su comportamiento reológico con el de las Formulaciones 1 y 2 propuestas como solución industrial para la pasta sin gluten en hojas.

2.1 Formulaciones y metodología de elaboración de láminas de pasta sin gluten.

La composición de la Formulación 1 es: 40-50% de harina de arroz vaporizado; 0-20% de harina de maíz; 0.6-1% de sal; 30-40% de agua caliente, entre 90-100°C; 0.1-0.5% de goma xantana; y 3.0-6.0% de albúmina (porcentajes en peso total de la mezcla). La Formulación 2 es igual que la Formulación 1 pero eliminando la harina de maíz de la composición, y la Formulación 3 solamente

incorpora harina de arroz vaporizado y agua caliente con respecto a la Formulación 1.

En la elaboración de la pasta sin gluten en hojas se han seguido varias etapas: (i) Etapa de preparación de la masa, donde primero se mezclan todos los ingredientes secos y posteriormente se amasan enérgicamente en una tolva cuando se incorpora el agua caliente (el hidrocólido añadido debe ser previamente disuelto en una pequeña porción de agua); (ii) Etapa de laminado, que se realiza mediante rodillos, para alcanzar el espesor final deseado, en torno a 1,5 mm; (iii) Etapa de pre-cocción, donde la pasta se cuece en un baño de agua hirviente, a 90-100°C, durante un tiempo de 3 a 4 minutos; y (iv) Etapa de enfriamiento de la lámina de pasta, en túnel de duchas de agua potable, hasta una temperatura de 15-40°C.

Como las láminas de pasta se emplean para la elaboración de platos preparados, a continuación se realizaría el cortado de las láminas en tiras y el relleno (como canelones por ejemplo), y una vez colocados en sus envases, son enfriados y comercializados como platos precocinados de pasta sin gluten frescos o congelados.

2.2 Análisis de Textura

El análisis de resistencia a tracción de las láminas de las tres formulaciones se ha realizado utilizando un texturómetro TA.XTPlus (de Stable Micro Systems) con célula de carga de 5 kg. Las distintas muestras de lámina de pasta, de 1.3 mm de grosor, se sometieron a dos tipos de ensayo: Ensayo de Tracción Uniaxial (con sonda A/SPR de este texturómetro, de análisis de aros de pasta) y Ensayos de Tracción Biaxial (con sonda HDP/TPB específico para análisis de láminas de pasta). En el ensayo de tracción biaxial se acopló la plataforma HDP/90 de este texturómetro. Las diferentes formulaciones estudiadas se analizan en estado crudo, que se corresponde con láminas de pasta recién laminada, y cocidas, correspondiéndose con las láminas pre-cocidas y enfriadas.

En el Ensayo de Tracción Uniaxial, las distintas láminas de pasta se recortaron en aros para su análisis. Los aros (obtenidos mediante el accesorio de este Texturómetro, denominado A/NPLT) se colocaron entre dos rodillos que se desplazan uniaxialmente y en direcciones opuestas hasta la rotura del aro de pasta. En este ensayo se registra la Fuerza (g) Máxima aplicada al aro de pasta hasta rotura, y la Extensibilidad (mm), como alargamiento máximo que alcanza el aro de pasta hasta su rotura. Este ensayo se

realiza a una velocidad de 3 mm/s y con una fuerza de activación de 5 g.

En el Ensayo de Tracción Biaxial, la medida se realiza directamente sobre la lámina de pasta sujeta en el soporte HDP (del texturómetro) en todos sus bordes. La sonda A/SPR con punta esférica comprime (con una velocidad de avance de 1 mm/s) la lámina en el centro, de forma que ésta empieza a estirar hasta la rotura. Durante el transcurso del ensayo se registran los datos de Fuerza (g) Máxima aplicada hasta rotura de la lámina, y Extensibilidad (mm), como deformación máxima que se alcanza hasta su rotura.

3. Resultados y Discusión

Los resultados de Fuerza Máxima y de Extensibilidad del Ensayo de Tracción Uniaxial están representados en las Figuras 1 y 2. Se puede apreciar que para las Formulaciones 1 y 2, la lámina cocida tiene, en promedio, mayor resistencia a la tracción, y una mayor extensibilidad sin romperse, que la Formulación 3, lo que permite que puedan aguantar las condiciones de trabajo a escala industrial, donde se manejan láminas de más de 0,5 m de anchura y varios metros de longitud. En la Tabla 1 se pone de manifiesto que, mediante las Formulaciones 1 y 2, se incrementa la Fuerza Máxima en tracción uniaxial en la pasta cocida (que es donde más resistencia se necesita para que se pueda manejar a escala industrial) hasta en un 89% y la Extensibilidad hasta en un 64% respecto de la Formulación 3. Además, al incluir harina de maíz (Formulación 1) se mejora el color de la pasta (y la resistencia biaxial, tal como se ve en las Figuras 3 y 4), dando lugar a una lámina de pasta con características sensoriales (y de textura en boca) muy similares a las de harina de trigo. También, la inclusión de albúmina y goma xantana (que tampoco incluye la Formulación 3) hace que mejore la textura y la sensación en boca de la pasta sin gluten objeto de esta invención.

En cuanto a los Ensayos de Tracción Biaxial (que reproducen mejor las condiciones de tracción en la elaboración industrial de pastas en hojas), tal como se puede apreciar en las Figuras 3 y 4, que muestran los resultados correspondientes de Fuerza Máxima y de Extensibilidad, con las Formulaciones 1 y 2, se vuelve a poner de manifiesto que estas formulaciones dan lugar a una lámina cocida que, en promedio, tiene mayor resistencia a la tracción, y una mayor extensibilidad sin romperse, que la Formulación

3, lo que hace posible que pueda aguantar las condiciones de trabajo a escala industrial. De nuevo, hay que resaltar que la Formulación 3 no aguantaría las condiciones de trabajo industriales de fabricación de pasta sin gluten, que se describen en este trabajo.

En la Tabla 2 (de resultados de ensayos de tracción biaxial) se pone en evidencia que, mediante las Formulaciones 1 y 2 se incrementa la Fuerza Máxima en la pasta cocida hasta en un 159% y la Extensibilidad hasta en un 127% respecto de la Formulación 3.

Los resultados anteriores se corresponden con la observación experimental de que la pasta en hojas preparada solamente con harina de arroz vaporizado y agua caliente (Formulación 3) es relativamente quebradiza y difícil de manejar en hojas, y en trozos de pequeño tamaño. Se rompe con facilidad en estado crudo, y más en estado cocido. Esto quiere decir que no aguantaría las condiciones de manufactura industrial.

4. Conclusiones

La harina de arroz vaporizado, enriquecida con albúmina de huevo y goma xantana, es un ingrediente adecuado para la elaboración de hojas de pasta sin gluten.

La incorporación del agua a 90-100°C a la formulación mejora el comportamiento de la masa, actuando en la gelatinización y gelificación del almidón del arroz, creando una estructura reforzada y más resistente.

La tecnología que propone este trabajo mejora la calidad y puede reducir el precio de los platos de pasta sin gluten ya que no implica grandes cambios en la tecnología tradicionalmente usada.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] Sozer N., 2009. Rheological properties of rice pasta dough supplemented with proteins and gums. *Food Hydrocolloid*, 23: 849-855.
- [2] Marti A., Seetharaman K., Pagani M. A. 2010. Rice-based pasta: A comparison between conventional pasta-making and extrusion-cooking. *J Cereal Sci*, 52(3), 404-409.

[3] Boluda Aguilar M., López-Gómez A., Soto-Jover S. 2015. Composición y procedimiento de elaboración industrial de pasta sin gluten en hojas. Patente Española nº 2474920.

[4] Seng T.T. 1998. Preparation of instant rice noodles. US 5786018.

[5] Hsu J.Y., Wedral E.R. 1991. Rice pasta. EP 0450310 A1.

[6] Grugni G., Mazzini F., Viazzo G., Viazzo N. 2009. Process for the production of rice pasta and product obtained thereby. EP 2110026 A1.

[7] Werner S. 2007. Method for the production of pasta, pasta obtainable according hereto and system for carrying out said method. US 2007190216 A1.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Incremento de la fuerza y la extensibilidad, en tracción uniaxial, de las láminas de pasta (Formulaciones 1 y 2) sin gluten con respecto a la Formulación 3.

Formulación	Δ Fuerza (%)	Δ Extensibilidad (%)
1 (Cruda)	18,191	-1,207
1 (Cocida)	89,841	64,247
2 (Cruda)	25,668	32,626
2 (Cocida)	46,559	44,252

Tabla 2. Incremento de la fuerza y la extensibilidad, en tracción biaxial, de las láminas de pasta (Formulaciones 1 y 2) sin gluten con respecto a la Formulación 3.

Formulación	Δ Fuerza (%)	Δ Extensibilidad (%)
1 (Cruda)	66,424	39,637
1 (Cocida)	159,916	127,415
2 (Cruda)	18,936	-10,966
2 (Cocida)	96,892	79,510

Figura 1. Fuerza máxima de las pastas obtenidas con las distintas formulaciones, sometidas a tracción uniaxial.

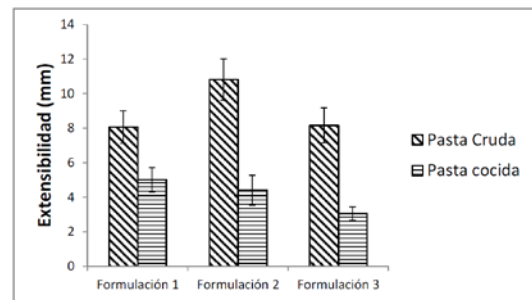


Figura 2. Extensibilidad de las pastas obtenidas con las distintas formulaciones, sometidas a tracción uniaxial.

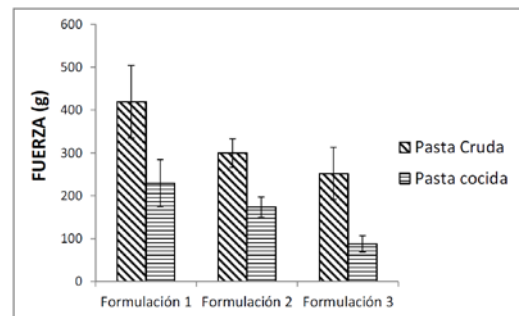


Figura 3. Fuerza máxima de las pastas obtenidas con las distintas formulaciones, sometidas a tracción biaxial.

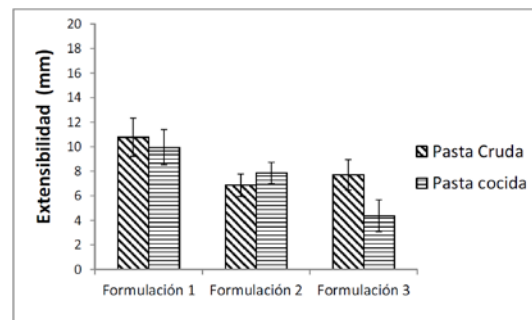
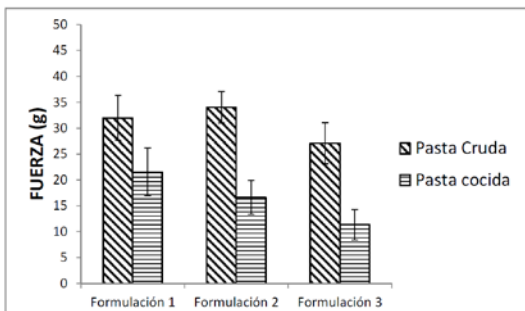


Figura 4. Extensibilidad de las pastas obtenidas con las distintas formulaciones, sometidas a tracción biaxial.



Effect of application of elicitors on the yield and quality of tomato

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

Equipo de Calidad Alimentaria. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Murcia, España. E-mail: virginia.hernandez5@carm.es

Resumen

En este trabajo se estudia el efecto de metil jasmonato (MeJA) y ácido salicílico (AS) sobre el rendimiento y contenido en compuestos bioactivos en tomate cultivado bajo invernadero. Se aplicaron cinco tratamientos: 100 μM y 1000 μM MeJA, 50 μM y 200 μM AS y un control, sobre los frutos de los racimos 2 y 7. Los tratamientos con MeJA aumentaron el número de frutos. Sin embargo, en el tratamiento con 100 μM , el peso de los frutos disminuyó respecto al control. Los tratamientos con AS aumentaron la producción total debido a un aumento del número de frutos. En los tratamientos con MeJA no se observaron diferencias significativas en el contenido de carotenoides, pero sí una disminución de los ácidos hidroxycinnámicos (100 μM y 1000 μM MeJA) y un aumento de las flavanonas (100 μM MeJA). Los tratamientos con AS aumentaron la concentración de licopeno y flavanonas en frutos tratados con la dosis más baja (50 μM). Los resultados muestran el potencial de MeJA y AS para aumentar el rendimiento de tomate sin disminuir la concentración de la mayoría de los compuestos bioactivos analizados, e incluso, en el caso de AS, aumentando el contenido de determinados metabolitos de interés.

Palabras clave: fitohormonas, estrés abiótico, bioactivos, *Solanum lycopersicum*.

Abstract

This work studies the effect of methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) on total fruit yield and the content in bioactive compounds, in tomatoes grown under greenhouse. Five treatments were applied: 100 μM and 1000 μM MeJA, 50 μM and 200 μM SA and a control, all applied over the fruits of the trusses 2 and 7. MeJA treatments increased the number of fruits. However, fruit mean weight decreased in the treatment with 100 μM MeJA with regard to the control. SA treatments increased yield due to an increase of the fruit number. Treatments with MeJA did not affect carotenoids content, but a decrease in hydroxycinnamic acids (100 μM y 1000 μM MeJA) and an increase in flavanones (100 μM MeJA) were observed. SA treatments increased the concentration of lycopene and flavanones in fruits treated with the lowest dose (50 μM). The results show the potential of MeJA and SA to enhance tomato yield without decreasing the concentration of the most of the analyzed bioactive compounds and even in the case of SA, increasing the content of certain metabolites of interest.

Keywords: phytohormones, abiotic stress, bioactives, *Solanum lycopersicum*

1. Introducción

Los bioestimulantes vegetales son moléculas que pueden mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos en diversas condiciones de crecimiento y manejo. En concreto, metil jasmonato (MeJA) y ácido salicílico (AS) son compuestos que actúan como moléculas señalizadores en multitud de rutas metabólicas, involucradas principalmente en la respuesta de la planta ante diferentes tipos de estrés [1]. Aunque la principal aplicación de MeJA y AS ha sido la de inducir resistencias a patógenos en cultivos hortícolas, existen evidencias de que también son capaces de mejorar el desarrollo de la planta, el rendimiento de los cultivos y la calidad de los frutos, aumentando así su resistencia ante condiciones medioambientales adversas, como es el estrés

por alta temperatura [2]. Sin embargo, existe escasa información sobre su efecto sobre la productividad y composición final de los frutos. En este trabajo se estudia el efecto de MeJA y AS, sobre la producción y contenido de compuestos bioactivos de interés (compuestos fenólicos y principales carotenoides) en tomate cultivados bajo invernadero, en condiciones de alta temperatura.

2. Materiales y Métodos

Las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Boludo) se cultivaron bajo invernadero durante el periodo comprendido entre enero y julio. La temperatura máxima alcanzada durante el periodo de recolección (mayo-julio) fue de 42 $^{\circ}\text{C}$. Se aplicaron un total de cinco tratamientos:

100 μM y 1000 μM MeJA, 50 μM y 200 μM AS y un control, al que se le aplicó el mismo agente mojante utilizado en los tratamientos (etanol 0.2 % v/v). Cada uno de los tratamientos se aplicó tres veces consecutivas sobre los frutos del 2º y 7º racimos, 4, 7 y 15 días antes de ser recolectados. Se estableció un diseño experimental de bloques al azar, constituido por dos bloques por tratamiento y tres repeticiones por bloque, cada una constituida por tres plantas. Para la determinación del rendimiento de la planta, se recolectaron la totalidad de los frutos. Para el análisis de los compuestos bioactivos, se muestrearon frutos procedentes de los racimos 2 y 7 (por separado), seleccionando frutos totalmente rojos, no sobremaduros, exentos de defectos. Los carotenoides se extrajeron según el método descrito por Bohm [3]. La separación y cuantificación se realizó según la metodología descrita por Hernández et al. [4]. El extracto obtenido se analizó en un cromatógrafo líquido Agilent 1200 (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector diodos array (DAD). Los compuestos fenólicos se extrajeron según el método descrito por Vallverdú-Queralt et al. [5]. El extracto obtenido se analizó en un cromatógrafo líquido Agilent 1200 (Waldbronn, Alemania) acoplado a detector espectrómetro de masas triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS 21.

3. Resultados y Discusión

Los tratamientos con MeJA aumentaron el número total de frutos (Tabla 1) probablemente debido a un efecto positivo de MeJA sobre la floración en tomate [6]. Sin embargo, en el tratamiento con la dosis más baja (100 μM MeJA), el peso medio de los frutos disminuyó significativamente, mientras que en el tratamiento con la dosis más alta (1000 μM MeJA) no se observaron diferencias respecto al control. Como resultado, solo se observó un ligero aumento de la producción total en las plantas tratadas con la mayor dosis de MeJA. Estos resultados sugieren que, a pesar del efecto estimulador del tratamiento 100 MeJA sobre el número de frutos, el peso de los mismos puede disminuir para compensar una posible disminución de la proporción fuente/sumidero [7]. Los tratamientos con AS aumentaron la producción total, debido a un aumento del número de frutos (Tabla 1). Al igual que en los tratamientos con MeJA, no se observaron diferencias respecto al control en el peso medio

de los frutos tratados con la dosis más alta, aunque si una disminución, en este caso no significativa, en los frutos tratados con la menor dosis.

Los tratamientos con MeJA no afectaron a la concentración de β -caroteno y licopeno, independientemente del racimo estudiado (Tabla 2). Respecto a los tratamientos con AS, la aplicación de una concentración de 50 μM dio lugar a un aumento del contenido de licopeno en ambos racimos. Por otro lado, se observó una disminución de la concentración de carotenoides en el racimo 7 respecto al 2 en los tratamientos con MeJA y SA, atribuible a una disminución de la relación fuente/sumidero [7] y en el caso de licopeno, al aumento de temperatura a lo largo del ciclo de cultivo [8].

En la bibliografía existen numerosos trabajos que describen un aumento de la concentración de compuestos fenólicos en hortalizas, como resultado de la aplicación exógena de jasmonatos y ácido salicílico [9,10]. Sin embargo, en tomates tratados con MeJA y AS se observó una disminución significativa de la concentración de ácidos hidroxicinámicos totales (calculada como la suma de ácido cafeico-*O*-hexosido, ácido felúrico-*O*-hexosido, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido dicafeoilquinico) y de la de flavonoles totales (calculada como la suma de rutin, rutin-*O*-hexosido, rutin-*O*-pentosido y quercetín), independientemente de la dosis aplicada. Por el contrario, en los tratamientos con 100 μM MeJA y 50 μM AS se observó un aumento significativo de la concentración de flavanonas (calculada como suma de isómeros de naringenín-*O*-hexosido). Otros autores han descrito un efecto estimulador de MeJA y AS sobre la ruta de los fenilpropanoides que conduce a la acumulación de compuestos fenólicos requeridos para reforzar la pared celular y estimular la biosíntesis de AS, como mecanismo de defensa de la planta contra el estrés [11]. En nuestro estudio se evidencia la influencia de la dosis utilizada sobre la acumulación de los diferentes grupos de compuestos fenólicos y por lo tanto, la necesidad de más estudios con el fin de optimizar el manejo de la aplicación de estos elicitores. Al contrario de lo observado en carotenoides, la concentración de compuestos fenólicos fue mayor en el racimo 7 respecto al 2.

Las temperaturas máximas alcanzadas durante el desarrollo y maduración de los frutos del racimo 7 fueron aproximadamente 7 °C superiores a las

alcanzadas durante el desarrollo del racimo 2. Por tanto, la mayor concentración de compuestos fenólicos observada en frutos del racimo 7 puede ser atribuida a un mecanismo de defensa de la planta ante situaciones de estrés abiótico, producido por las altas temperaturas [12].

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran la utilidad del ácido salicílico para aumentar el rendimiento de tomate bajo condiciones de alta temperatura, favoreciendo la producción de frutos sin disminuir la calidad. El efecto de metil jasmonato sobre la producción y calidad fue menor y solo se observó un aumento del número de frutos.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con fondos FEDER (proyecto PO07-042).

6. Referencias bibliográficas

[1] Pastori G.M., Foyer C. H. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated control. *Plant Physiol.* 129: 460-468.

[2] Cronjé M.J., Bornman L. 1999. Salicylic acid influences Hsp70/Hsc70 expression in *Lycopersicon esculentum*: dose- and time-dependent induction or potentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 422-427.

[3] Bohm V. 2001. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C-30 high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 24: 955-959.

[4] Hernández V., Hellín P., Fenoll J., Flores P. 2015. Increased temperature produces changes in the bioactive composition of tomato, depending on its developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 63: 2378-2382.

[5] Vallverdú-Queralt A., Jauregui O., Medina-Rejon A., Andres-Lacueva C., Lamuela-Raventos R.M. 2010. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray

ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24: 2986-2992.

[6] Wasternack C., Stenzel I., Hause B., Hause G., Kutter C., Maucher H., Neumerkel J., Feussner I., Miersch O. 2006. The wound response in tomato role of jasmonic acid. *J. Plant Physiol.* 163: 297–306.

[7] Bertin N., Buret M., Gary C. 2001. Insights into the formation of tomato quality during fruit development. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76: 786-792.

[8] Gautier H., Diakou-Verdin V., Benard C. 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1241-1250.

[9] Kim H.J., Fonseca J.M., Choi J.H., Kubota C. 2007. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55: 10366–10372.

[10] Pérez-Balibrea S., Moreno D., Garcia-Viguera C. 2011. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chem.* 129: 35-44.

[11] Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 23: 283–333.

[12] Wittstock U., Gershenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5: 300–307.

Tabla 1. Producción (kg), número y peso medio de fruto (g) en plantas tratadas con metil jasmonato y ácido salicílico.

	Dosis (µM)	Producción (kg)	Nº frutos	Peso (g)
MeJA	0	3,98	44,7 ^a	46,7 ^b
	100	4,02	55,5 ^b	37,7 ^a
	1000	4,79 ns	53,3 ^b **	47,6 ^b *
AS	0	3,98 ^a	44,67 ^a	46,74
	50	4,73 ^b	55,83 ^b	43,12
	200	4,78 ^b **	52,17 ^b **	47,14 ns

Tabla 2. Efecto de la dosis y del racimo sobre la concentración de los carotenoides, all-*trans* β caroteno (all tr β), all-*trans* licopeno (all tr lic), ácidos hidroxicinámicos totales, flavonoles totales y flavanonas totales ($\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$) en frutos de tomate tratados con metil jasmonato.

		all. tr. β	all tr. lic	ac. hidroxi.	flavonoles	flavanonas
Dosis	0 (control)	8,8	17,7	29,8 ^b	12,1	2,9 ^a
	100	8,9	21,0	21,7 ^a	10,9	3,7 ^b
	1000	8,8	21,0	21,6 ^a	8,1	2,8 ^a
		n.s.	n.s.	**	n.s.	*
Racimo	2º	9,4	21,0	21,4	6,6	1,7
	7º	8,3	18,5	27,3	14,1	4,6
		*	*	*	***	***
Interacción						
Racimo	Dosis					
2º	0 (control)	9,4	18,1	25,4	7,7	1,3
	100	10,0	23,1	16,8	7,0	2,1
	1000	8,7	22,0	21,9	5,2	1,7
7º	0 (control)	8,2	17,2	34,2	16,5	4,5
	100	7,3	18,1	26,5	14,9	5,3
	1000	8,9	20,0	21,2	11,0	3,9
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 3. Efecto de la dosis y del racimo sobre la concentración de los carotenoides, all-*trans* β caroteno (all tr β), all-*trans* licopeno (all tr lic), ácidos hidroxicinámicos totales, flavonoles totales y flavanonas totales ($\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$) en frutos de tomate tratados con ácido salicílico.

		all. tr. β	all tr. lic	ac. hidroxi.	flavonoles	flavanonas
Dosis	0 (control)	8,8	17,6 ^a	29,8 ^b	12,1	2,9 ^a
	50	8,0	22,3 ^b	24,0 ^a	10,9	3,4 ^b
	200	7,9	15,9 ^a	22,2 ^a	8,9	2,7 ^a
		n.s.	*	**	n.s.	*
Racimo	2º	8,4	20,3	24,5	7,1	1,6
	7º	8,2	16,7	26,2	14,2	4,4
		n.s.	*	n.s.	***	***
Interacción						
Racimo	Dosis					
2º	0 (control)	9,4	18,0	25,4 ^a	7,7	1,3
	50	8,0	24,0	25,9 ^a	8,1	2,0
	200	7,8	18,7	22,2 ^a	5,6	1,6
7º	0 (control)	8,2	17,2	34,2 ^b	16,5	4,5
	50	8,0	20,5	22,2 ^a	13,7	4,9
	200	8,0	12,2	22,2 ^a	12,3	3,9
		n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.

Water stress to enhance vitamin C in extra early nectarines

N. Falagán^(1,2), F. Artés^(1,2), P.A. Gómez⁽²⁾, F. Artés-Hernández^(1,2), J.M. de la Rosa⁽³⁾, E. Aguayo^(1,2)

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

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

⁽³⁾ Grupo de 'Suelo-Agua-Planta'. Dpto. de Producción Vegetal. ETSIA-UPCT

Resumen

Durante 3 años se estudió el efecto del riego deficitario controlado (RDC) sobre el contenido en vitamina C de la nectarina extra temprana "VioWhite 5" en cosecha, durante almacenamiento refrigerado (0°C; 90-95% humedad relativa (HR) y tras simulación de comercialización (15°C; 70-75% HR), centrándose en la relación con la enzima ascorbato peroxidasa (APX). Como estrategias de riego: i) Testigo, regado al 110% de la ETC (máxima evapotranspiración del cultivo); ii) RDC₁, regado al 110% ETC durante los periodos críticos y al 85% del Testigo durante el resto de temporada; iii) RDC₂, regado al 110% ETC durante los periodos críticos y al 80 y 60% Testigo durante la segunda etapa de crecimiento del fruto y en postcosecha, respectivamente. La respuesta del fruto sujeto a RDC mostró la existencia de estrés hídrico siendo dependiente de la intensidad y duración del RDC. Se observó que el comportamiento de la enzima APX y el contenido del ácido dehidroascórbico se podían utilizar como indicadores bioquímicos de estrés abiótico. La piel acumuló más vitamina C que la pulpa. Como conclusión, RDC es una práctica que permite el ahorro de agua (780 y 2.050 m³/ha año para RDC₁ y RDC₂, respectivamente) y mejora el contenido de vitamina C a través de la estimulación de APX.

Palabras clave: factores precosecha, vitamina C, ascorbato peroxidasa.

Abstract

During 3 consecutive years, the effect of regulated deficit irrigation (RDI) strategies on vitamin C at harvest, during cold storage (0°C; 90-95% relative humidity (RH) and after retail sale period (15°C; 70-75% RH) of extra early nectarine 'VioWhite 5' was studied, focusing on ascorbate peroxidase (APX) response. RDI strategies were programmed as: i) Control, irrigated at 110% of ETC (maximum crop evapotranspiration); ii) RDI₁, irrigated at 110% ETC during critical periods of growth and at 85% of Control during the rest of growing season. iii) RDI₂, irrigated at 110% ETC during critical periods of growth and at 80 and 60% Control during second fruit growth stage and late postharvest, respectively. The RDI application on extra early nectarines showed the existence of water stress on fruit response. This stress was dependent on RDI intensity. APX activity and dehydroascorbic acid levels revealed as good indicators of this abiotic stress. Peel metabolism was higher than pulp one and accumulated more vitamin C. Water savings were important: 780 and 2,050 m³/ha year for RDI₁ and RDI₂, respectively. As conclusion, RDI can be used as a water-reducing field practice demand while enhancing vitamin C through the activation of APX activity.

Keywords: preharvest factors, vitamin C, ascorbate peroxidase.

1. Introducción

El melocotonero y nectarino [*Prunus persica* (L.) Batsch] es el frutal de hueso más importante a nivel mundial, siendo el tercer árbol de fruta dulce cultivada tras el manzano y el peral [1]. Nutricionalmente, las nectarinas contienen compuestos bioactivos como polifenoles o vitaminas con alto potencial antioxidante [2]. El consumo de este tipo de compuestos reduce el riesgo de padecer enfermedades [3]. En este trabajo se seleccionó la variedad extratemprana "VioWhite 5", con calibre y características organolépticas adecuadas para el mercado

europeo. Sin embargo su cultivo sólo es posible en áreas con altas temperaturas e inviernos suaves, como la cuenca mediterránea. Estas zonas padecen importantes periodos de sequía [4]. Para compatibilizar su cultivo con la escasez de recursos hídricos se recurre a estrategias de riego deficitario controlado (RDC) [5,6]. Estudios previos han demostrado que el RDC permite la mejora de la calidad de la fruta mejorando el color de la piel, incrementado los sólidos solubles totales y por tanto, el sabor o reduciendo ataques fúngicos [7, 8, 9]. Además, se ha observado el fomento de la acumulación de compuestos

bioactivos [10, 11]. Estos compuestos bioactivos como el ácido ascórbico (AsA) pertenecen al sistema de defensa de la planta, sintetizándose cuando se detecta un ataque como puede ser un estrés abiótico como el estrés hídrico.

El objetivo de este estudio fue conocer el efecto del RDC sobre la nectarina extratemprana “VioWhite 5” durante un periodo de 3 años consecutivos, específicamente sobre el contenido en vitamina C y la respuesta de la enzima ascorbato peroxidase (APX).

2. Materiales y Métodos

El cultivo de nectarina “VioWhite 5” se desarrolló durante las campañas 2011-2013 en una parcela en plena producción (Molina de Segura, Murcia). Se aplicaron tres tratamientos de riego: testigo, regado al 100% de la evapotranspiración (ETC), RDC₁ y un RDC₂ (riego durante todo el ciclo como el testigo excepto el período postcosecha donde fue de un 84 y 60% del testigo, respectivamente).

Los frutos de cada tratamiento se trasladaron a la Planta Piloto del Grupo de Postrecolección y Refrigeración donde cada tratamiento de riego se almacenó durante 10 días a 0°C y 95% HR, seguidos de 3 días a 15°C y 75% HR de comercialización. En cada uno de ellos, se tomó muestra tanto de piel como de pulpa y se congeló con nitrógeno líquido y molió con un molinillo (IKA, A 11 basic, Berlin, Alemania) para su conservación a -80 °C. En los días 0 (inicial), 10 (fin de conservación) y 10+3 (fin de comercialización) se estudió la evolución de las siguientes respuestas:

2.1 Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

La extracción de la enzima APX se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Nakano y Asada [12]. Un gramo de tejido se agitó con un homogeneizador (Ultraturrax, T-25, IKA-WERKE, Germany) con 4 mL de una solución tampón de fosfato de sodio (50 mM; pH 7), que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,1 mM), ácido ascórbico (AsA; 1 mM) y polivinilpirrolidona (PVPP; 1%). A continuación, se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se purificó usando columnas PD10 (Sephadex G25, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Todo el proceso se realizó en condiciones refrigeradas y oscuridad. Las medidas se realizaron con un espectrofotómetro de placas (Tecan Infinite M2000, Männedorf, Switzerland) a 290 nm. La actividad se expresó como U/mg proteína, donde una U de APX se definió como la cantidad de enzima necesaria que causa la

oxidación de 1 μmol de AsA por min a 30 °C ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2 Contenido en vitamina C

El procedimiento se llevó a cabo según Silveira et al. [13]. Se pesaron cinco gramos de muestra en tubos cónicos protegidos de la luz y se homogeneizaron (Ultraturrax, T-25, IKA-WERKE, Germany) durante 30 s. con 10 mL de una solución tampón de ácido cítrico (0,1 M ácido cítrico, 0,05% EDTA, 4 mmol/L NaF and 50 mL/L MeOH en agua nanopura). A continuación, se filtró con una gasa y se ajustó el pH con HCl (6 N) a 2,3-2,4. La muestra se extrajo en fase sólida con columnas Sep-Pak C18 (Waters, Mildford, MA) previamente activadas. 750 μL del extracto se guardó en un vial ámbar de 1,5 mL. Después, 250 μL de una solución de dihidroclorito 1,2-phenilenediamina (35 mg/100 mL) se añadió al vial que fue analizado tras 37 min de incubación a temperatura ambiente con un HPLC (Series 1100 Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). El contenido total de vitamina C se expresó como la suma de AsA y ácido dehidroascórbico (DHA) en 100 g de peso fresco (p.f.).

3. Resultados y Discusión

Respecto a la enzima APX, se observó inicialmente una mayor actividad en piel, especialmente en las nectarinas sometidas a RDC₂ ($1,22 \pm 0,02 \text{ U/mg proteína vs. } 1,06 \pm 0,03$ y $0,67 \pm 0,04 \text{ U/mg proteína}$, para RDC₁ y testigo, respectivamente). En la pulpa, sin embargo, no se detectaron diferencias entre tratamientos en el día 0. Se observó una tendencia decreciente en todos los tratamientos, siendo RDC₂ el que mantuvo la mayor actividad tanto en piel como en pulpa (Fig. 1).

El contenido en vitamina C se analizó como la suma de sus dos formas biológicamente activas: AsA y DHA (Fig. 2). En el caso de AsA, la piel del tratamiento testigo alcanzó el mayor contenido al final de la simulación de comercialización ($17,87 \pm 0,01 \text{ mg AsA/100 g p.f. vs. } 12,92 \pm 0,41$ y $8,46 \pm 0,67 \text{ mg AsA/100 g p.f. de RDC}_1$ y RDC₂, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias en las pulpas de ningún tratamiento. El comportamiento observado en DHA fue opuesto. La piel de las nectarinas sometidas a RDC₂ mostró un contenido mayor que el resto de tratamientos durante todo el experimento. Respecto a la vitamina C, RDC₂ presentó inicialmente la mayor concentración ($44,12 \pm 0,76 \text{ mg AsA/100 g p.f. vs. } 40,92 \pm 1,71$ y $36,26 \pm 0,74 \text{ mg AsA/100 g p.f. de la piel de RDC}_1$

y testigo, respectivamente). Estos valores mostraron una tendencia decreciente durante la conservación refrigerada y al final del estudio no se encontraron diferencias entre tratamientos (Fig. 2). La pulpa siguió la misma tendencia pero en un rango de concentración menor (Fig. 2).

La estimulación de la síntesis y acumulación de compuestos bioactivos mediante factores ambientales como puede ser el estrés hídrico, es una vía interesante para obtener productos nutricionalmente más sanos [14]. En vista de los resultados, el nivel de estrés afectó a la oxidación de AsA en DHA, a través de la activación de APX. En las nectarinas testigo, se encontró un mayor contenido en AsA que DHA, implicando una correlación negativa entre estas respuestas. Este hecho se debe a una mayor actividad de APX en los frutos sometidos a RDC. La tendencia decreciente citada en todos los tratamientos fue debida a los procesos de maduración y senescencia durante la conservación frigorífica y el periodo de comercialización [15].

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos confirman la existencia de estrés hídrico al aplicar RDC en la nectarina extratemprana. Este estrés indujo un cambio en la enzima APX y este cambio es dependiente de la duración e intensidad del RDC. En este sentido, los frutos sometidos a RDC tuvieron una mayor actividad de APX y un incremento de DHA, considerando por tanto a ambos como indicadores de estrés abiótico. La piel es el tejido que presenta mayor contenido y actividad frente a la pulpa por lo que es recomendable su consume. Además se produjo un considerable ahorro de agua: 780 and 2.050 m³/ha y año de RDC₁ y RDC₂, respectivamente. En definitiva, un manejo del estrés hídrico a través de estrategias de RDC promueve la síntesis de compuestos bioactivos en nectarina extratemprana.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

[1] Donoso Contreras, J.M. 2014. Genética de la introgresión de genes del almendro (*Prunus dulcis* Mill.) en el melocotonero [*P. persica* (L.)

Batsch]: desarrollo de una estrategia de selección de líneas casi isogénicas (Nils) con marcadores moleculares. Tesis doctoral.

[2] García-Parra, J., González-Cebrino, F., Delgado, J., Lozano, M., Hernández, T., Ramírez, R. 2011. Effect of thermal and high-pressure processing on the nutritional value and quality attributes of a nectarine purée with industrial origin during the refrigerated storage. *J. Food Sci.* 76: 618-625.

[3] Maasland, D.H., Van den Brandt, P.A., Kremer, B., Goldbohm, R.A., Schouten, L.J. 2015. Consumption of vegetables and fruits and risk of subtypes of head-neck cancer in the Netherlands Cohort Study. *Int. J. Cancer.* 136: 396-409.

[4] Iglesias, A., Garrote, L., Flores, F., Moneo, M. 2007. Challenges to manage the risk of water scarcity and climate change in the Mediterranean. *Water Resour. Manag.* 21: 775-788.

[5] Domínguez, A., De Juan, J.A., Tarjuelo, J.M., Martínez, R.S., Martínez-Romero, A. 2012. Determination of optimal regulated deficit irrigation strategies for maize in a semi-arid environment. *Agr. Water Manage.* 110: 67-77.

[6] Goldhamer, D.A. 1989. Drought irrigation strategies for deciduous orchards, Publ. no. 21453, Cooperative Extension, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources.

[7] Crisosto, C.H., Johnson, R.S., Luza, J.G., Crisosto, G.M. 1994. Irrigation regimes affect fruit soluble solids concentration and rate of water loss of 'O'Henry' peaches. *HortScience.* 29: 1169-1171.

[8] Falagán, N., Artés, F., Gómez, P.A., Artés-Hernández, F., Conejero, W., Aguayo, E. 2014. Deficit irrigation strategies combined with controlled atmosphere preserve quality in early peaches. *Food Sci. Technol. Int.* DOI: 10.1177/1082013214553997.

[9] Mpelasoka, B.S., Behboudian, M.H., Mills, T.M. 2001. Effects of deficit irrigation on fruit maturity and quality of 'Braeburn' apple. *Sci. Hort.* 90: 279-290.

[10] Pérez-Pastor, A., Ruiz-Sánchez, M.C., Martínez, J.A., Nortes, P.A., Artés, F., Domingo, R. 2007. Effect of deficit irrigation on apricot fruit quality at harvest and during storage. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2409-2415.

[11] Barbagallo, R.N., Di Silvestro, I., Patanè, C. 2013. Yield, physicochemical traits, antioxidant pattern, polyphenol oxidase activity and total visual quality of field-grown processing tomato

cv. Brigade as affected by water stress in Mediterranean climate. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1449-1457.

[12] Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.

[13] Silveira, A.C., Aguayo, E., Artés, F. 2013. The suitability of three Galia melon cultivars and different types of cuts for the fresh-cut industry. *J. Sci. Food Agric.* 93: 3826–3831.

[14] Poiroux-Gonord, F., Bidel, L.P., Fanciullino, A.L., Gautier, H., Lauri-López, F., Urban, L. 2010. Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *J. Agric. Food Chem.* 58: 12065-12082.

[15] Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel J.L., Caris-Veyrat, C., Génar M. 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *J. Agr. Food Chem.* 56: 1241–1250.

Figuras

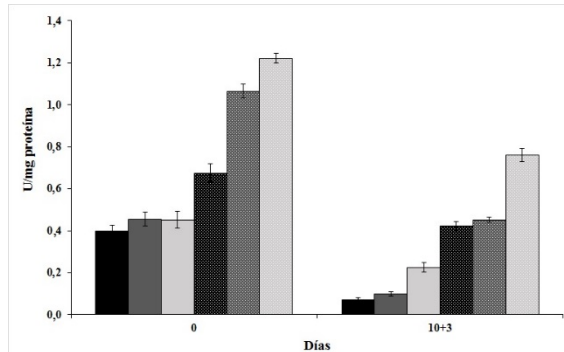


Figura 1. Actividad de la enzima APX en nectarinas “VioWhite 5” sometidas a tratamientos de riego: testigo, RDC₁ y RDC₂ y almacenadas durante 10 días a 0 °C más 3 días a 15 °C. Los datos representan la media de 3 repeticiones (n = 3 ± SE).

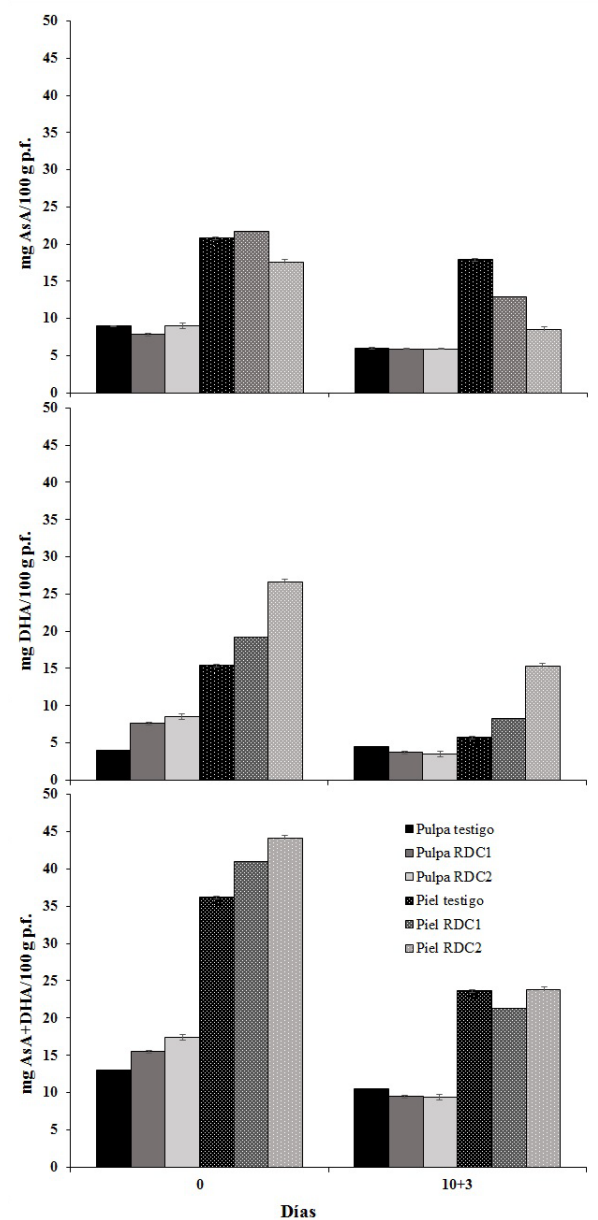


Figura 2. Contenido en vitamina C de nectarinas “VioWhite 5” sometidas a tratamientos de riego: testigo, RDC₁ y RDC₂ y almacenadas durante 10 días a 0 °C más 3 días a 15 °C. La vitamina C total se reportó como la suma de ácido ascórbico (AsA) y ácido dehidroascórbico (DHA) por 100 g de peso fresco (p.f.). Los datos representan la media de 3 repeticiones (n = 3 ± SE).

Phytosteranes determination in almonds depending on the cultivar and growing conditions (conventional versus ecological)

A.M. Carrasco del Amor ^(1,2), A. Gil Izquierdo ⁽³⁾, E. Aguayo ^(1,2)

⁽¹⁾ Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Dpto. Ingeniería de Alimentos, ETSIA-UPCT. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España. Tel.: 968325750. anacarrascodelamor@gmail.com

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

⁽³⁾ Dpto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Campus Universitario de Espinardo, 25. Apto. 164. 30100 Espinardo (Murcia). Tel.: 968396363.

Resumen

En el año 2000, se descubrieron unos compuestos denominados fitoprostanos obtenidos por la oxidación no enzimática del ácido α -linolénico. Las almendras contienen un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados siendo el ácido α -linolénico uno de los más importantes para la salud. En este trabajo se propone la cuantificación de fitoprostanos en almendras y averiguar si éstos están influidos por el tipo de variedad y condiciones de cultivo (convencional frente a ecológico). Como resultado, mencionaron que se encontraron 7 tipos de fitoprostanos aunque no todas las variedades los presentaban. El fitoprostano 9-F1t-PhytoP fue el más abundante, aunque también se obtuvieron otros fitoprostanos en menor concentración tipo 9-epi-9E1t-PhytoP, 9-E1t-PhytoP, 16-B1-phytoP y 9-L1-PhytoP. Se obtuvo una influencia en función del tipo cultivo siendo "Marcona" y "Largueta" las variedades que presentaron mayor contenido de fitoprostanos en cultivo convencional. Sin embargo, las variedades, "Planeta", "Colorada", "Atocha", "Garriges" y "Avellanera", mostraron una mayor concentración en cultivo ecológico.

Palabras clave: ácido α -linolénico; ROS; espectrometría de masas; UHPLC

Abstract

In 2000, compounds named Phytosteranes (phytoP) generated by non-enzymatic oxidation of α -linolenic acid were discovered. Almonds kernels have a high content of polyunsaturated fatty acids being the α -linolenic acid, one of the most important fatty acids for human health. In this work the PhytoP quantification in almonds is proposed and it is studied the cultivar and growing conditions (conventional versus ecological). Results showed the existence of seven types of PhytoP although not all cultivars contained all of them. 9-F1t-PhytoP was the most abundant, although others PhytoPs were also obtained in lower concentrations as type 9-epi-9E1t-PhytoP, 9-E1t-PhytoP, 16-B1-phytoP and 9-L1-PhytoP. A cultivar influence combined with growing conditions was found. 'Marcona' and 'Largueta' cultivars, under conditional conditions, showed the higher total PhytoPs content. In contrast, 'Planeta', 'Colorada', 'Atocha', 'Garriges' and 'Avellanera' cultivars showed a greater concentration under ecological conditions.

Keywords: α -linolenic acid, ROS, mass spectrometry, UHPLC.

1. Introducción

En la década de los setenta, se demostró que las prostaglandinas eran compuestos que podían ser formados por la autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados purificados in vitro [1,2]. No fue hasta 1990, cuando se descubrió, en mamíferos, la biosíntesis de una serie de isómeros de las prostaglandinas derivados del ácido araquidónico [3].

Las plantas superiores carecen de ácido araquidónico (C20:4 ω 6), por lo que los isoprostanos no pueden ser sintetizados. Sin

embargo, el ácido α -linolénico (C18:3, ω -3) es el ácido graso poliinsaturado más abundante en determinadas plantas y frutos secos. Los fitoprostanos son generados a partir del ácido α -linolénico por vía no enzimática [4]. Estos compuestos son considerados marcadores fiables de estrés oxidativo en plantas superiores [5] y su cuantificación es muy reciente [6]. En la actualidad hay una veintena de publicaciones sobre este tema, lo que demuestra que en este campo todavía queda mucho por investigar, en particular en frutos secos.

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

Los frutos secos son fuente de numerosos nutrientes para la salud, incluyendo ácidos grasos poli y monoinsaturados, proteínas, aminoácidos esenciales, fibra, vitamina E, magnesio y cobre, así como, una colección de fitoquímicos saludables como fitoesteroles, flavonoides y proantocianidinas [7,8-9]. Las primeras investigaciones confirman que la genética, origen, momento de recolección, condiciones ambientales, composición del suelo y madurez del fruto afectan a la composición de las almendras y otros frutos secos [10,11-12]. Por todo lo expuesto, este trabajo tiene como objetivo cuantificar el contenido de fitoprostano presentes en almendras y saber si éstos varían con el tipo de cultivo, convencional frente a ecológico.

2. Materiales y Métodos

2.1 Reactivos

Hexano (Proquilab, Murcia, España), Bis-Tris (bis 2-hydroxyethyl) amino-tris (hydroxymethylmethane), metanol, acetronitrilo y 2,6-di-butyl hidroxianisol (BHA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE, Strata X-AW, 100 mg/3mL) adquiridos en Phenomenex (Torrance, CA, EEUU).

2.2 Preparación de las muestras

Se utilizaron almendras procedentes de la cooperativa COATO (Totana, Murcia) cuyos árboles se cultivaron en condiciones de secano y bajo sistema convencional o ecológico. Las muestras fueron molidas en un molinillo de café hasta convertirlas en un polvo fino. Se tomaron 2-3 g de peso fresco que fue suspendido en una disolución que contenía 10 mL de BHA (10:01 v/v), se agitó durante 5 minutos, se centrifugó (2000 *xg*) durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante filtrándose en un *Sep Pack*.

2.3 Extracción de las muestras

Los fitoprostano presentes en las almendras fueron aislados mediante una extracción líquido-líquido (LLE) seguida de una extracción en fase sólida (SPE). La extracción LLE se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: 1 mL de la

muestra filtrada se disolvió en 1 mL de n-Hexano [9]. La solución fue diluida en 2 mL de metanol, se agitó y se volvió a diluir en 2 mL de BIS-TRIS buffer (0,02 M, HCl, pH=7). Seguidamente, se separó mediante los cartuchos de fase sólida, según el proceso previamente descrito por Medina y colaboradores [10]. Previamente, los cartuchos se acondicionaron con 2 mL de hexano, 2 mL de metanol y 2 mL de agua MilliQ. Cada muestra se filtró en un ratio de alrededor de una gota cada 2 segundos, después de esto, los cartuchos fueron lavados con 2 mL de hexano, 2 mL de agua MilliQ, 2 mL de una solución que contenía agua MilliQ y metanol (3/1) y 2 mL de acetronitrilo para eliminar los compuestos indeseados. El compuesto deseado fue elucado con 1 mL de metanol y fue secado usando un evaporador SpeedVac (Savant SPD121P, ThermoScientific, MA, EEUU). El extracto seco fue reconstituido con 200 μ L de A/B disolventes (90:10, v/v), conteniendo el disolvente A una mezcla de agua MilliQ/0.01% de ácido acético y una solución de metanol/0.01% de ácido acético fue usado como disolvente B. A continuación, las muestras fueron sonicadas y centrifugadas (1000 *xg*) durante 10 minutos para ser filtradas (0.45 μ m, Millipore, MA, EEUU).

Finalmente, 20 μ L de esta muestra fue inyectada y analizada en UHPLC–QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

3. Resultados y Discusión

Se identificaron 7 tipos de fitoprostano: 9-F_{1t}-PhytoP, Ent-16-epi-16-F_{1t}-PhytoP +ent-16-F_{1t}-PhytoP, 9-epi-9-F_{1t}-PhytoP, 9-epi-9-D_{1t}-PhytoP, 9-D_{1t}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, 9-L₁-PhytoP. La concentración de cada uno de ellos dependió del tipo de cultivo analizado. El fitoprostano 9–F_{1t}-PhytoP fue el más abundante (6.748,6 \pm 78,4 a 1.909,9 \pm 898,0 ng/100 g) y los fitoprostano 9-epi-9E_{1t}-PhytoP, 9-E_{1t}-PhytoP, 16-B₁-phytoP y 9-L₁-PhytoP presentaron una menor concentración. Los fitoprostano 9-epi-9-D_{1t}-PhytoP y 9-D_{1t}-PhytoP sólo se obtuvieron en tres variedades, ‘Planeta’, ‘Colorada’ y ‘Avellanera’.

Como sucede con los isoprostano F₂ presentes en mamíferos, los fitoprostano F₁ se encuentran normalmente en los lípidos de la membrana [13]. Como se ha mencionado anteriormente, estos compuestos son marcadores fiables del estrés oxidativo en plantas superiores y el tipo de cultivo es un factor que influye en la concentración de los mismos (Tabla 1). Este trabajo demuestra que el tipo y concentración de

fitoprostanos presentes en almendras depende de la variedad y además, está sujeta a las condiciones de cultivo. Trabajos previos han demostrado que la composición química de almendras está en función de la genética, variabilidad ambiental, procedencia geográfica, temperatura y dotación hídrica [14-15]. Las variedades “Marcona” y “Largueta” presentaron un mayor contenido de fitoprostanos totales para cultivo convencional (Tabla 1). Sin embargo, “Planeta”, “Colorada”, “Atocha”, “Garriges” y “Avellanera”, mostraron una mayor concentración de fitoprostanos en cultivo ecológico.

Esto podría deberse al efecto de la variedad, sistema de cultivo o a la interacción de ambos factores, que conlleva a que las almendras sean más propensas a la autooxidación.

4. Conclusiones

Se identificaron 7 tipos de fitoprostanos aunque no todas las variedades estudiadas presentaron todos ellos. Los fitoprostanos del tipo F1, mostraron una mayor concentración. Se obtuvo una influencia en función del tipo cultivo siendo “Marcona” y “Largueta” las que presentaron el mayor contenido de fitoprostanos en cultivo convencional.

5. Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT y al CEBAS-CSIC la utilización de algunos equipos. Queremos destacar la colaboración desinteresada de la Cooperativa COATO (Totana, Murcia) por su aportación varietal.

6. Referencias bibliográficas

[1] Nugteren, D. H., Vonkeman, H., Van Dorp, D. A. 1967. Non-enzymatic conversion of all-*cis* 8, 11, 14-eicosatrienoic acid into prostaglandin E1. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*.86:1237–1245.
 [2] Pryor, W. A., Stanley, J. P., Blair, E. 1976. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*. 11:370–379.
 [3] Morrow, J. D., Harris, T. M., Roberts, L. J. 1990. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem*. 184:1–10.

[4] Imbusch, R., Mueller, M. J., 2000. Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F1 (Phytoprostanes F 1) in Plants 1. *Plant Physiol*.124:1293-1303.

[5] Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A. K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Mueller, M. J. 2003. Cyclopentenoneisoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J*. 34(3): 363–37.

[6] Imbusch, R., Mueller, M. J. 2000. Formation of Isoprostane F2- like compounds (Phytoprostanes F1) from α - linolenic acid in plants. *Free Radical Bio. Med*. 28:720-726.

[7] Bolling, B. W., Chen, C. Y., McKay, D. L., Blumberg, J. B. 2011. Tree nut phytochemicals: Composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr. Res. Rev*. 24(2): 244-275.

[8] King, J. C., Blumberg, J., Ingwersen, L., Jenab, M., Tucker, K. L. 2008. Tree nuts and peanuts as components of healthy diet. *J. Nutr*. 138(9): 1736-1740.

[9] Li, D., Yao, T., Siriamornpun, S. 2006. Alpha-linolenic acid content of commonly available nuts in Hagzhou. *Int. J. Vitam.Nutr. Res*.76(1): 18-21.

[10] Lavedrine, F., Ravel, A., Villet, A., Ducros, V., Alary, J. 2000. Mineral composition of two walnut cultivars originating in France and California. *Food Chem*. 68: 347–351.

[11] Parcerisa, J., Rafecas, M., Castellote, A. I., Codony, R., Farrán, A., García, J., et al. 1995. Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: (III) oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). *Food Chem*. 53: 71–74.

[12] Wakeling, L. T., Mason, R. L., D_Arcy, R. B., Caffin, N. A. 2001. Composition of pecan cultivars Wichita and Werstern Schley [*Caryailinoensis* (Wangenh) grown in Australia. *J. Agr. Food Chem*. 49(3): 1277–1281.

[13] Morrow J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A., Roberts, L.J. 1992. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed *in situ* in phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*.89:10721–10725.

[14]Kodad, O., Alonso, J. M., Espiau, M. T., Estopañán, G., Juan, T. 2011. Chemometric characterization of almond germ plasm: compositional aspects involved in quality and breeding. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*.136: 273-281.

[15] Kodad, O., Estopañán, G., Juan, T., Alonso, J., Espiau, M., Socias i Compan, R. 2014. Oil content, fatty acid composition and tocopherol concentration in the Spanish almond gene bank collection. *Sci. Hortic-Amsterdam*.177: 99-107.

Tabla 1. Contenido total de fitoprostanos (ng/100 g) en diferentes variedades de almendra cultivadas secano bajo cultivo convencional (C) o ecológico (E).

Cultivar	Tipo de cultivo	Total
Planeta	C	5633,6 ± 28,3
	E	9108,3 ± 108,8
Marcona	C	15180,9 ± 59,1
	E	10733,6 ± 255,4
Colorada	C	5346,5 ± 69,4
	E	6843,7 ± 189,3
Largueta	C	13095,8 ± 76,2
	E	7698,5 ± 76,2
Garriges	C	4025,0 ± 123,9
	E	8313,2 ± 121,5
Atocha	C	6310,8 ± 105,3
	E	8801,3 ± 99,5
Avellanera	C	4274,7 ± 45,4
	E	6312,5 ± 82,7

Epiphytic microbial load changes of natural purple fresh vegetables smoothies during shelf life

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

Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia. gerardo.gonzalez@utp.ac.pa.
Instituto de Biotecnología Vegetal - IBV. Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, Murcia, España.

Resumen

Para aumentar la ingesta de frutas y hortalizas la industria ofrece nuevos elaborados naturales a base de batidos o purés de frutas y hortalizas en base a la demanda del consumidor. En la mayoría de los casos, las mezclas de frutas y hortalizas son seleccionadas en base a color, sabor, textura bebible y, especialmente, a garantizar la alta concentración de nutrientes con contenido de baja energía. Las hortalizas tienen características nutricionales muy saludables fundamentalmente por los compuestos antioxidantes. Sin embargo, poseen la desventaja de que tras su procesado, las reacciones metabólicas degradativas se aceleran, ocasionando su rápido deterioro. En este trabajo se evaluará la composición idónea de un batido o 'smoothy' morado a base de hortalizas frescas mediante un análisis sensorial. Posteriormente se determinará la evolución de la calidad microbiológica alterante sin procesado térmico durante la conservación a 7, 25 y 37°C alcanzando una vida comercial refrigerada de más de dos semanas.

Palabras clave: calidad sensorial; puré; seguridad alimentaria.

Abstract

To increase the intake of fruit and vegetables, the industry offers new natural elaborates based on smoothies or puree according to consumer demand. In most cases, mixed fruit and vegetables are selected in the basis of color, flavor and texture especially to ensure the high concentration of nutrients with low energy content. Vegetables has healthy nutritional compounds mainly by antioxidants. However, they have the disadvantage that after processing, the metabolic degradative reactions are accelerated, causing quick deterioration of such quality attributes. In this work, an optimum composition of a natural purple fresh vegetables smoothy according to sensory analysis is evaluated. The epiphytic microbial load changes during 7, 25 and 37 ° C is also assayed determined reaching more than 2 weeks of shelf life under refrigerated conditions. In this work the microbiological analysis will be evaluated for zero time and different temperatures of conservation (7, 25, and 37 ° C) in vegetable purple smoothies. Firstly, the proper composition of purple smoothie of fresh vegetables was determined by sensory and rheological analysis.

Keywords: Sensory quality; puree; food safety.

1. Introducción

A menudo se aplica procesamiento térmico excesivo a los productos que tienen una vida útil prolongada, perjudicando su calidad. Aunque en los últimos años, bacterias más resistentes al calor han supuesto nuevos desafíos en los procesos de esterilización/pasteurización industrial para asegurar la inocuidad de los alimentos y evitar el deterioro [1].

Los zumos, como los alimentos más ácidos, con frecuencia se dañan debido a la contaminación con bacterias aerobias resistentes a ácidos, junto con levaduras y mohos. Las frutas y hortalizas contienen los nutrientes necesarios para apoyar el rápido crecimiento de patógenos alimentarios.

Aunque los brotes de enfermedad alimentaria causada por el consumo de frutas y hortalizas son menos frecuentes que los brotes que implican otros alimentos, su incidencia y gravedad ha aumentado en los últimos años. Este mayor nivel de protección es debido en parte a la pasteurización apropiada y a la presencia de barreras externas como la epidermis, que evitan la entrada de microorganismos y posterior crecimiento en el interior de la fruta u hortalizas [2]. Esto resulta de gran importancia debido a que los batidos de hortalizas frescas estudiadas en este trabajo presentan un pH ligeramente ácido que ronda entre 4,5 y 4,8.

Tradicionalmente, el tratamiento térmico se ha utilizado para garantizar la seguridad de los

alimentos contra patógenos y microorganismos de deterioro, aunque esto inevitablemente conduce a la destrucción de nutrientes sensibles del calor, textura, color, sabor y aroma. Para mantener la calidad sensorial y nutricional, la industria alimentaria busca tratamientos menos agresivos. Las frutas y hortalizas frescas no reciben ningún tratamiento térmico y están generalmente libres de conservantes, haciéndolos susceptibles a la degradación y la colonización por microorganismos, induciendo cambios microbiológicos y organolépticos indeseables en el sabor, aroma o color y seguridad alimentaria [3].

Actualmente, para aumentar la ingesta de frutas y hortalizas como una alternativa o una adición al consumo de frutas y hortalizas frescas, la industria alimentaria ofrece nuevos elaborados naturales a base de zumos, batidos o purés de frutas y hortalizas en base a las tendencias de demanda por parte de los consumidores. En la mayoría de los casos, las mezclas de frutas y hortalizas son seleccionadas en base a color, sabor, textura bebible y, especialmente, a garantizar la alta concentración de nutrientes con contenido de baja energía. Como consecuencia, los batidos o 'smoothies' podrían contribuir a esta oferta de frutas y hortalizas, especialmente para personas que no las consumen frescas debido principalmente a la disponibilidad de mercado o conveniencia, o simplemente por el atractivo de la forma de ingesta. Dependiendo de la fabricación y composición, un batido de frutas puede ser suficiente para reemplazar el valor nutricional de al menos una porción de frutas u hortalizas [4].

Un batido o puré de hortalizas es una suspensión dispersa de materiales de la célula vegetal en una fase de fluido que contiene pectinas solubles. Las pectinas en la fase fluida unen agua y pueden formar geles. Un tratamiento térmico induce la degradación de la pectina, así como formación de gel. La gelificación de una fruta o puré de hortaliza implica un comportamiento reológico [5].

En este trabajo se evaluará la calidad sensorial, reológica y microbiológica (alterante) durante la conservación a varias temperaturas en batidos morados a base de hortalizas frescas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Obtención de formulación del producto

Las experiencias expuestas en este trabajo se realizaron en base al batido seleccionado mediante un análisis sensorial en una sala de

catas regulada por un panel de catadores entrenados. Los productos vegetales utilizados en esta formulación fueron: pepino, remolacha, brócoli, repollo morado y uvas moradas apirenas para mejorar el sabor y ofrecerle el componente acuoso.

2.2 Análisis sensorial

El análisis de perfil sensorial, también conocido como descriptivo, es el proceso durante el cual un panel de asesores capacitados anota varios atributos sensoriales de un producto. Sin embargo, hay poca información sobre esto para alimentos de componentes variados tales como batidos de frutas. Esta información es de valor para el perfil sensorial de los alimentos [6].

Se evaluó la apariencia visual, sabor, textura y calificación global mediante una escala hedónica en intensidad de 1 a 5 de cuatro formulaciones previas en una sala de catas homologada (IBV – UPCT) mediante un panel entrenado formado por 12 personas (Fig. 1).

2.3 Reología de los batidos de hortalizas frescas

Se realizó un barrido de frecuencia y se evaluó la viscosidad a través de una curva de flujo de las muestras seleccionadas.

2.4 Procesado y conservación

La mezcla en diversas proporciones de fruta y hortalizas, previamente lavadas, se trituró en un robot de cocina sin aplicación de tratamiento térmico (Thermomix - TM 21, Vorwerk, Spain). La mezcla se envasó en tubos falcon de 50 mL en condiciones de asepsia. Dichos tubos se dispusieron para su conservación en oscuridad a 7, 25 y 37°C.

2.4 Calidad microbiológica alterante

Se determinó la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos totales durante 18 días de conservación a 7, 25 y 37°C [1].

3. Resultados y Discusión

3.1 Análisis Sensorial

Tras el análisis sensorial se determinó como mejor formulación la el batido compuesto por pepino (34.01 %), remolacha (11.90 %), uvas moradas apirenas (42.52 %), brócoli (8.06 %) y repollo morado (3.40 %) por presentar los mejores atributos de calidad (Fig. 2).

3.2 Reología de los batidos de hortalizas frescas

Las propiedades reológicas de una fruta u hortaliza están influenciadas por la composición de materias primas, concentración de partículas, dureza y morfología, distribución de tamaño de partícula, interacciones de partículas, pectinas solubles y pectinas sobre las superficies de partícula, temperatura [5]. Se presenta el barrido de frecuencia del batido de fruta y hortalizas seleccionado (Fig. 3). El comportamiento reológico puede ser explicado por la formación de gel y es suficiente para describir el comportamiento de la viscosidad adecuado para su vida comercial.

3.3 Contaminación microbiológica detectada en materia prima y producto terminado

La presencia de microorganismos aerobios mesófilos totales fue frecuente en la materia prima y en el batido no tratado térmicamente. La evolución del crecimiento microbiano fue muy parecida en los batidos conservados a 25 y 37°C, alcanzando valores superiores a 7 Log UFC/mL tras 15 días. Los batidos conservados a 7°C presentaron valores entre 4 y 4,5 Log UFC/mL tras 15 días (Fig. 4). Por ello, y atendiendo a atributos sensoriales se determinó una vida comercial de 18 días a 7°C y de 15 días a temperatura ambiente. No hubo presencia de microorganismos patógenos en todo momento según establece la legislación vigente [7].

4. Conclusiones

Es posible obtener un producto natural a base hortalizas frescas durante al menos dos semanas en refrigeración. Se produce un incremento en la carga microbiana alterante por lo que es preciso estudiar en un futuro un tratamiento térmico que preserve la seguridad del producto, pero que minimice las alteraciones de los otros atributos de calidad. Por ello será preciso estudiar alternativas de procesado mínimo.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias Bibliográficas

- [1] Esteban M., Conesa R., Huertas J.P., Palop A. 2015. Effect of thymol in heating and recovery media on the isothermal and non-isothermal heat resistance of *Bacillus* spores. *J. Food Microbiol.* 48. 35-40.
- [2] Vantarakis A., Affifi M., Kokkinos P., Tsibouxi M., Papapetropoulou M. 2011. Occurrence of microorganisms of public health and spoilage significance in fruit juices sold in retail markets in Greece. *Anaerobe.* 17. 288-291.
- [3] Silveira A.C., Aguayo E., Artés F. 2013. Shelf-life and quality attributes in fresh-cut *Galia* melon combined with fruit juices. *Food Sci. Technol. Res.* 50. 343-348.
- [4] Di Cagno R., Minervini G., Rizzello C., De Angelis M., Gobbetti M. 2011. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol.* 28. 1062-1071.
- [5] Tibäck E., Langton M., Oliveira J., Ahrné L. 2014. Mathematical modeling of the viscosity of tomato, broccoli and carrot purees under dynamic conditions. *J. Food Eng.* 124. 35-42.
- [6] Keenan D.F., Brunton N.P., Mitchell M., Gormley R., Butler F. 2012. Flavour profiling of fresh and processed fruit smoothies by instrumental and sensory analysis. *Food Res. Int.* 45. 17-25
- [7] Regulation EC 1441/2007. 2007. Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union.* 32: 12-29.

Figuras

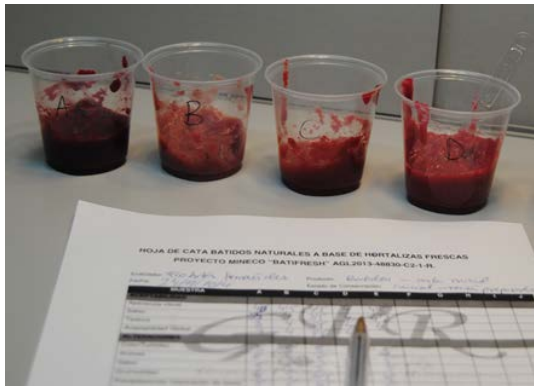


Fig. 1: Fotografía resumen del análisis sensorial en sala de catas homologada (IBV-UPCT)

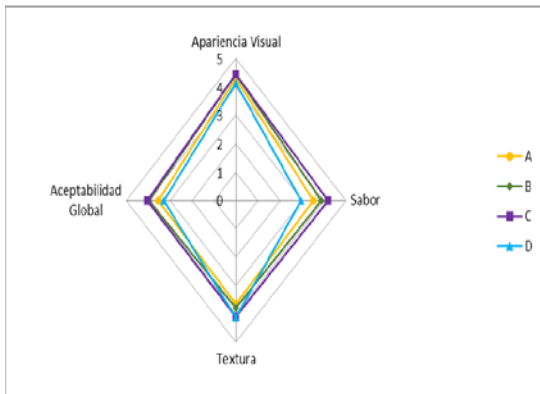


Fig. 2: Resultados del análisis sensorial de varios batidos morados de hortalizas frescas.

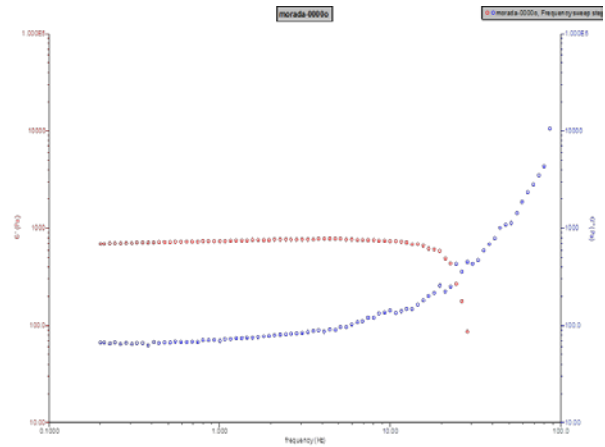


Fig. 3: Barrido de frecuencia de batidos de fruta y hortalizas.

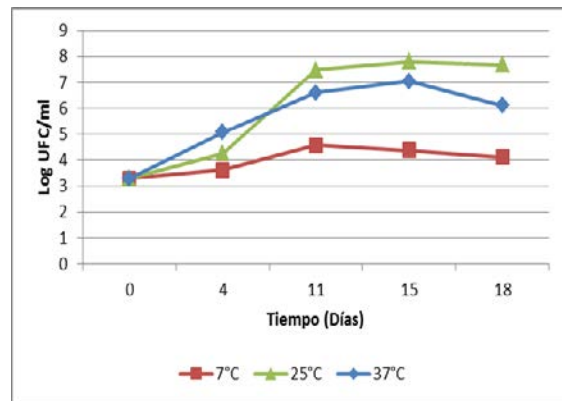


Fig. 4: Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales en batidos morados de hortalizas frescas conservados a 7°C, 25°C, y 37°C.

Effect of high pressure homogenization against pasteurization on a nutraceutical product with a high 10-hydroxy-2-trans-decenoic acid content and vitamin C

A. García-González⁽¹⁾, P.A. Gómez⁽²⁾, E. Aguayo^(1,2)

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

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

Resumen

La aplicación de altas presiones de homogeneización (APH) en alimentos es reciente, limitada casi exclusivamente a zumos y leches. Hasta ahora, nunca se había utilizado en productos nutraceuticos, donde el mantenimiento de la calidad sensorial, microbiológica y, muy especialmente, funcional durante su periodo de vida útil es primordial para el consumidor. En el presente trabajo se analizó si la aplicación de APH (80 y 120 MPa) podrían ser un tratamiento sustitutivo de la pasteurización (80 °C, 15 min) de un jarabe funcional rico en jalea real, fuente natural de aporte de ácido 10-hidroxi-2-trans-decenoico, y vitamina C. La evaluación se efectuó sobre los parámetros citados después de someter el producto a condiciones de estabilidad acelerada y a largo plazo. Como resultado cabe mencionar que la aplicación de APH redujo en un 60% las pérdidas de vitamina C frente a un tratamiento térmico convencional. El contenido en 10-hidroxi-2-decenoico también se vio afectado por el tratamiento térmico, consiguiéndose reducir las pérdidas totales de este compuesto en un 30 % mediante el empleo del tratamiento de APH. El empleo de APH logró mantener la calidad funcional del producto nutraceutico evaluado pudiéndose aplicar a escala industrial.

Palabras clave: jalea real; jarabe funcional; vida útil; degradación.

Abstract

The application of high standardization pressures (APH) in food is recent and limited almost exclusively to juice and milk. Until now, it has never been used on nutraceutical products, where the maintenance of sensorial, microbiological and especially functional quality during their lifetime is essential for the consumer. During the current study, it was analysed the APH application (80 and 120 MPa) as a replacement treatment for pasteurization (80°C, 15 min) of a functional syrup rich in royal jelly, natural source of 10-hydroxy-2-trans-decenoic acid, and vitamin C. The assessment was performed on the mentioned parameters after subjecting the product to accelerated stability conditions and in a long-term. As a result, we can mention that the APH application decreased in 60% the loss of vitamin C against a conventional thermal treatment. The 10-hydroxy-2-trans-decenoic content was also affected by the thermal treatment, leading to a decrease of the overall loss of this compound in 30% by using the APH treatment. APH use achieved to keep the functional quality of the assessed nutraceutical product, which can be applied at an industrial level.

Keywords: Royal jelly; functional syrup; shelf life; degradation.

1. Introducción

La alta presión de homogeneización (APH) es una técnica emergente de gran interés en la industria de alimentos. Se conoce desde finales del siglo XIX, sin embargo, es en la década de 1980 cuando se empieza a investigar de forma exhaustiva. En 1986 salieron al mercado los primeros alimentos presurizados procesados de tipo ácido como zumos y derivados de frutas [1] y en 1995 se comercializaban mermeladas y salsas. Con el fin de minimizar la pérdida de calidad, y encontrar una alternativa a los tratamientos térmicos para productos de larga vida útil, la técnica de APH

adquiere un gran interés. Es una tecnología de procesado que combina la alta presión con mínima temperatura, reduciendo la degradación de compuestos bioactivos, permitiendo la formulación y estabilidad de emulsiones, y dependiendo de las condiciones de APH aplicadas a los alimentos, puede conseguirse una degradación microbiana y enzimática [2,3]. Por otro lado, en la sociedad actual existe un interés por el consumo de alimentos bioactivos o nutraceuticos, que mejoran la calidad de vida de los consumidores. Estos productos ofrecen beneficios en la promoción y prevención de algunas enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, cáncer,

desórdenes del sistema autoinmune, diabetes, artritis y arritmia.

Basándonos en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad funcional de un producto nutraceútico rico en jalea real y vitamina C, al someterlo a un tratamiento térmico convencional o APH, averiguando si las altas temperaturas o presiones aplicadas causaban pérdidas de ingredientes bioactivos. Para evaluar la eficacia de la tecnología se analizó la vida útil a tiempo real durante 24 meses a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $60 \pm 5\%$ HR y en condiciones aceleradas durante 6 meses a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75 \pm 5\%$ HR.

2. Materiales y Métodos

Se utilizó un jarabe comercial (“Junior”) caracterizado por contener una fuente de aporte de ácido 10-hidroxi-2-trans-decenoico (2,5 mg/mL) combinada con vitamina C (9 mg/mL), estando indicado para la prevención de deficiencias de vitaminas y aporte de bioactivos relacionados con el sistema inmune. Se aplicaron tres tratamientos: Testigo (pasteurización a 80°C , 15 min, 0,1 MPa) y dos correspondientes a APH: 80 MPa (33°C , 2 segundos) y 120 MPa (43°C , 2 segundos) procesándose de forma continua sin tiempos de residencia. Una vez tratados los productos, se envasaron en envases de vidrio de color ámbar para evitar las pérdidas de compuestos funcionales por efecto de la oxidación lumínica y se sometieron a estudios de estabilidad en cámara a tiempo real ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $60 \pm 5\%$ HR) y en condiciones aceleradas (6 meses a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75 \pm 5\%$ HR). Para alcanzar la HR mencionada se empleó un sistema de humidificación industrial (Tecnidex control – TEC H, Valencia, España). Se utilizaron 3 repeticiones (botes) de 250 mL de jarabe por tratamiento y día de análisis en los que se determinaron el contenido en hierro y vitamina C.

2.1 Contenido en 10-hidroxi-2-decenoico

Se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, utilizando un equipo HPLC (Agilent Technologies serie 1200, Alemania). Para cada muestra se realizó una dilución (0,75:100) con agua desionizada. Se realizó la inyección de la muestra líquida en el equipo citado.

2.2 Vitamina C

Se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron en un tubo tipo falcón cubierto con papel de

aluminio, se adicionaron 10 mL de agua milli-Q y se agitó en un vortex. Seguidamente, las muestras se filtraron con un filtro de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$ (Micron Analítica S.A. Madrid, España) y se llevaron a un vial para la determinación por HPLC con detector de espectrofotometría UV-vis (Water 2695, Alliance, Singapur). La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva estándar de L-ácido ascórbico.

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

3. Resultados y Discusión

3.1. Contenido en ácido 10-hidroxi-2-trans-decenoico

El contenido en 10-hidroxi-2-trans-decenoico fue muy estable en los tratamientos de alta presión de homogeneización frente a las reducciones observadas en el tratamiento térmico, como se puede observar en los resultados obtenidos tanto en condiciones reales como aceleradas (Figura 1). Se apreciaron diferencias significativas entre las muestras pasteurizadas y las sometidas a APH, concluyéndose que este tipo de bioactivo se vio afectado por el tipo de proceso aplicado, estando las pérdidas asociadas al propio proceso de tratamiento y sobre todo al periodo de almacenamiento con valores de pérdida del 31%. Estas reducciones en términos totales se situaron en un 38 % para el caso del tratamiento térmico y sólo representó un 8 % para el caso de los tratamientos de alta presión (Tabla 1). La APH cumplió los valores que se proponen para la funcionalidad de este producto durante una vida útil de 24 meses.

3.2 Vitamina C

Destacar la caída significativa a tiempo 0 de la vitamina C debido al efecto térmico de la pasteurización, siendo la degradación mucho menor al utilizar tratamientos de APH (Figura 2). En la conservación a largo plazo, la utilización de ambos tratamientos de APH amortiguó la reducción de vitamina C frente al empleo de la pasteurización. Así, los porcentajes de pérdida observados fueron desde un 93% de pérdida total obtenidos en la pasteurización frente a los 34% y 38% obtenidos en los tratamientos de APH (Tabla 2), los cuales estarían dentro de los límites de tolerancia admitidos para una duración de la vida útil de 24 meses. Estas observaciones

coinciden con las analizadas en el ensayo predictivo o de estabilidad acelerada (Figura 2), donde se aprecia la tolerancia de esta vitamina a las APH, no existiendo desintegración o eliminación de la misma, con valores de pérdida de 5,9 y 8,6% para los tratamientos de 80 MPa y 120 MPa, respectivamente. La APH frente a la pasteurización permitió una mayor estabilidad de la vitamina C durante el procesado del producto. Las pérdidas de vitaminas tras el procesado de pasteurización fueron en gran medida dependientes del contenido de oxígeno disuelto. De esta forma el procesado mediante homogenización dinámica a APH permite reducir la incorporación de oxígeno durante el procesado al requerir de menor tiempo de mezcla en el reactor, principalmente por suprimir las etapas de enfriamiento de 80°C a 40°C con un tiempo de 15 a 30 minutos y la etapa de homogeneización de 15 a 20 minutos a segundos. Los tratamientos a APH permitieron mitigar factores que afectan directamente a la sensibilidad de esta vitamina como son los agentes oxidantes y la temperatura.

4. Conclusiones

La utilización de APH frente a un tratamiento térmico convencional permitió un mejor mantenimiento de los compuestos funcionales del producto y una mayor extensión de su vida útil, con una óptima calidad funcional. La pasteurización representó porcentajes de pérdidas de vitamina que quedaron fuera de los rangos de tolerancia admitidos para un periodo mínimo de vida útil de 24 meses.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

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

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

[3] Polisel-Scopel F.H., Hernández-Herrero M., Guamis, B., Ferragut, V. 2012. Comparison of

ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT – Food Sci. Technol.* 46: 42–48.

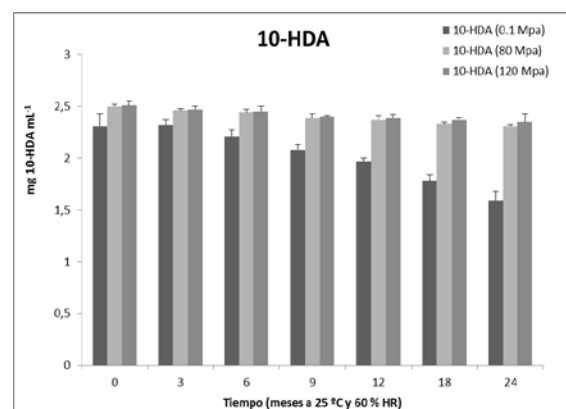
Tablas y Figuras

Tabla 1. Porcentaje de pérdidas de 10-HDA (10-hidroxi-2-trans-decenoico) a tiempo real de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad (24 meses, 25°C ± 2° C y 60 ± 5%).

Tiempo	0,1 MPa	80 MPa	120 MPa
Fin tratamiento (0 d)	7,60	< 1,00	< 1,00
Fin conservación (24 meses)	31,17	7,60	6,37
Total	38,77	< 8,60	< 7,37

Tabla 2. Porcentaje de pérdidas de vitamina C a tiempo real de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad (24 meses, 25°C ± 2° C y 60 ± 5%).

Tiempo	0,1 MPa	80 MPa	120 MPa
Fin tratamiento (0 d)	23,11	5,89	8,56
Fin conservación (24 meses)	69,94	28,93	29,89
Total	93,05	34,81	38,45



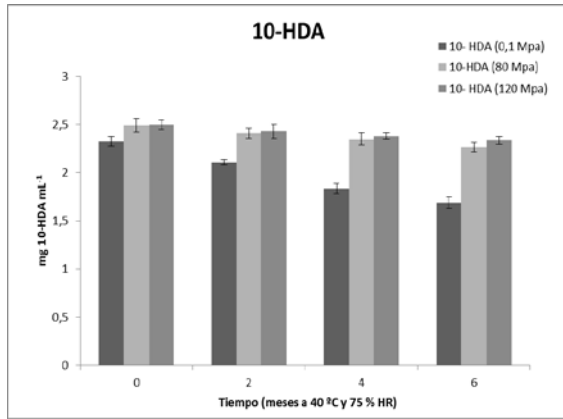


Figura 1. Contenido en 10-HDA (10-hidroxi-2-trans-decenoico) de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad a tiempo real (25°C ± 2º C y 60 ± 5% HR) o condiciones aceleradas (40º C ± 2 º C y 75 ± 5% HR)

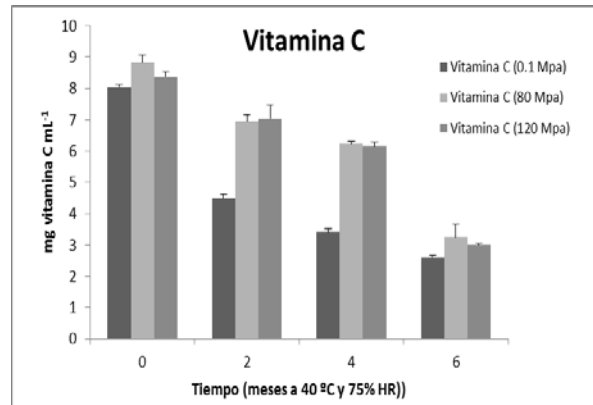
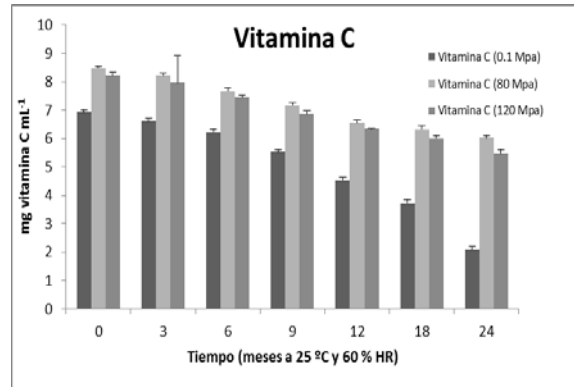


Figura 2. Contenido en vitamina C de un jarabe funcional tratado a diferentes presiones y sometido a estudio de estabilidad a tiempo real (25°C ± 2º C y 60 ± 5% HR) o condiciones aceleradas (40º C ± 2 º C y 75 ± 5 HR)

Optimization of chlorine sanitation to preserve quality of minimally processed *Vicia faba* seeds

M. Otón⁽¹⁾, F. Artés^(1,2), F. Artés-Hernández^(1,2)

⁽¹⁾ Instituto de Biotecnología Vegetal. UPCT. Campus Muralla del Mar. 30202 Cartagena, Murcia, España. mariano.oton@upct.es

⁽²⁾ Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Dpto. Ingeniería de Alimentos, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia, España. Tel.: +34 968 325509

Resumen

Se ensayó diversas concentraciones de NaClO en el agua de lavado para preservar la calidad de semillas de haba mínimamente procesadas en fresco durante 7 días a 3°C. Se lavó con agua de la red (testigo) y con diferentes concentraciones de hipoclorito (50 y 100 ppm) añadiendo en algunos casos ácido cítrico (200 ppm), pudiendo actuar como agente antipardeante o como potenciador de la acción del cloro. La duración de los tratamientos fue de 2 minutos y el tiempo de enjugado de 1 minuto, así como, la temperatura del agua fue en todos los casos de 5°C. Debido a un mal diseño del envase, la AM generada en el interior no fue la adecuada, lo cual perjudicó la calidad de las habas. Sin embargo la calidad microbiológica de las mismas fue aceptable 7 días a 3°C. Se necesitará optimizar primero el envase para sacar las conclusiones pertinentes en futuras experiencias.

Palabras clave: NaClO; atmósfera modificada; ácido cítrico; etileno; color.

Abstract

Several NaClO concentrations in the wash water was tested to preserve the quality of minimally processed *Vicia faba* seeds stored for 7 days at 3 °C. Washing treatments were: tap water (control) and with several NaClO concentrations (50 and 100 ppm) adding in some cases citric acid (200 ppm) that may act as antibrowning agent or as an enhancer of the chlorine action. Samples were washed for 2 minutes and rinsed for 1 minute. The water temperature in all cases was 5 °C. Due to a wrong package design, the MA generated was inadequate, which induced quality deterioration of the seeds. However, the microbiological quality was still acceptable after 7 days at 3°C. In further experiments the packaging will be needed to be optimized before drawing appropriate conclusions about NaClO dose optimization.

Keywords: NaClO; modified atmosphere packaging; citric acid; ethylene; color.

1. Introducción y Objetivos

En nuestro empeño por conocer la fisiología del haba y en la búsqueda de mantener la mayoría de sus características iniciales intactas, se desarrollaron los pasos para estudiar cómo afecta a la calidad sensorial y microbiológica de las semillas de habas bajo diferentes concentraciones de hipoclorito sódico con y sin la adición de ácido cítrico que además de actuar como agente antipardeante [1], lo hace como reductor del pH para que la acción bactericida del hipoclorito fuera más eficaz[2], [3].

Además se estudiará la presencia/ausencia de etileno en las bolsas preparadas, cómo evoluciona la atmósfera interior y el color durante la conservación.

2. Materiales y Métodos

Las habas de la variedad “Muchamiel”, se procesaron a 10°C en la sala de procesado en la Planta Piloto del Área de Tecnología de Alimentos de la UPCT y se embolsaron en un polipropileno

orientado (OPP) de 35µm de espesor (con permeabilidad de 900 cm³ O₂ m⁻² d⁻¹ atm⁻¹ y 1100 cm³ O₂ m⁻² d⁻¹ atm⁻¹ a 23 °C y 0% HR) conservándose a 3°C durante 7 días. Todas las bolsas tenían un peso de semillas de habas de 200 g.

Los tratamientos realizados fueron:

- **Testigo:** lavado con agua potable de la red a 5°C sin adición de cloro. Tratamiento testigo.

- **C50:** lavado con agua potable de la red a 5°C clorada con 50 ppm NaClO.

- **C100:** lavado con agua potable de la red a 5°C clorada con 100 ppm NaClO.

- **C50 + AC:** lavado con agua potable de la red a 5°C clorada con 50 ppm NaClO + 200 ppm de ácido cítrico.

- **C100 + AC:** lavado con agua potable de la red a 5°C clorada con 100 ppm NaClO + 200 ppm de ácido cítrico.

Todos los tratamientos fueron posteriormente enjugados con agua a 5°C durante 1 minuto.

2.1. Determinación de la composición gaseosa

Se determinó la concentración de O₂, CO₂ y etileno en el interior de los envases con semillas de haba bajo atmósfera modificada (AM) [4] durante la conservación frigorífica a 5°C. Se usó un Cromatógrafo de gases (ThermoFinnigan GC, Milán, Italia) provisto de un detector de conductividad térmica y un detector de ionización de llama.

2.2 Análisis sensorial

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

2.3. Análisis microbiológicos

Con el objeto de conocer el estado sanitario de las habas para comprobar que cumplían la legislación vigente [6], se tomaron tres réplicas de 30 g de habas que se introdujeron en bolsas estériles, junto con 270 mL de una solución de agua de peptona. Se llevaron a un digestor (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, España) durante 60 s. A partir de esta solución se preparó una batería de diluciones que se sembraron en placas Petri, disponiéndose en cada una de ellas 20 mL del medio de cultivo adecuado en cada caso. La carga microbiana se expresó como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo (log UFC g⁻¹).

2.4 Evolución del color

Las medidas de color se realizaron sobre 3 repeticiones de 10 habas cada una elegidas al azar para cada tratamiento en cada una de las salidas de conservación y al inicio de cada experiencia. Se determinó el color de la epidermis sobre tres puntos equidistantes en la zona ecuatorial del haba, utilizándose un diferenciador de color tri-estímulo “Chroma Meter modelo CR-300” de Minolta (Ramsey, N.J. USA). Se utilizó C como fuente de iluminación y 2º observador. Las coordenadas espaciales de color del sistema CIE Lab son L*, a* y b* (CIE, Commission Internationale de l’Eclairage).

2.5 Análisis estadístico

Para estudiar el efecto de los tratamientos sobre los distintos atributos de calidad, se realizó un ANOVA, y se establecieron diferencias significativas a P= 0,05 mediante el test de rango múltiple LSD empleando el programa informático Statgraphics plus versión 5.1.

3. Resultados y Discusión

3.1 Determinación de la composición gaseosa

Se observa en la Tabla 1 la escasa presencia de etileno y por tanto su escasa relevancia en la evolución de la calidad. La Fig. 1 muestra cómo se alcanzaron altas concentraciones de CO₂ en el séptimo día a 3°C, llegando incluso a 60 kPa, y una baja concentración de O₂ rozando el punto de extinción de la fermentación.

3.2 Análisis sensorial

Tras 7 días a 3°C los parámetros de “apariciencia visual, color, pérdida de brillo, deshidratación, pardeamiento y textura al masticar” obtuvieron unos valores calificados como de “no comercializables” debido a la inadecuada AM generada en el interior de los envases. En la Tabla 2, se representa la evolución del sabor y del olor, que fueron aceptados como comercializables. En el Testigo (T) se apreció un olor intenso a haba que persistió después de abrir la bolsa, siendo el tratamiento C100 + AC el que presentó una menor intensidad de olor. También se observó un alto grado de pardeamiento de las semillas de habas en todas las bolsas y un rápido pardeamiento al abrir las bolsas y dejarlas a 10°C breves momentos. Se notaron ligeros aromas relativos a la fermentación.

3.3 Color

El color externo de la epidermis de las semillas unos valores de los parámetros CIE Lab de L* = 71,70 a* = -14,17 no pudiendo medirse al final de los 7 días a 3°C por el alto grado de pardeamiento final que las hacía inviables, comercialmente hablando.

3.4 Análisis microbiológico

No se detectó la presencia de bacterias patógenas de acuerdo a la legislación vigente [6]. La Fig. 2, representa el recuento de enterobacterias y total de aerobios mesófilos como indicadores de alteración del producto, pudiendo afectar a la calidad final del mismo. En ambos casos no se consideran valores excesivamente altos tras 7 días a 3°C.

4. Conclusiones

Esta experiencia ha servido para estudiar un tipo de film para el envasado bajo AM, el cual no es aconsejado para productos de elevada intensidad respiratoria, como las habas. Ello es debido a que es necesario el envasado en un fil con mayor permeabilidad selectiva a los gases. Por ello será preciso en nuevas experiencias realizar un adecuado diseño del envase que se ajuste a la obtención de AM idóneas para la conservación. Se concluye igualmente la necesidad de añadir hipoclorito como agente desinfectante debido a

la baja contaminación ofrecida, aunque por los problemas comentados no se ha podido optimizar su concentración, cuyo objetivo se abordará en futuras experiencias.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] Artés F., Castañer M., Gil M.I. 1998. El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Food Sci. Tech. Int.* 4(6): 377-389.
- [2] Artés, F. y Artés-Hernández, F. 2003. Etapas decisivas y diseño de instalaciones para la elaboración de productos procesados en fresco. En: *Productos hortofrutícolas mínimamente procesados*. Editores: M.G. Lobo y M. González. Edit. Gobierno de Canarias. 57-78. ISBN 84-606-3514-7.
- [3] Allende A., Aguayo E., Artés F. 2004. Quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 109-117.
- [4] Artés F., Gómez P.A., Tomás-Callejas A., Artés-Hernández F. 2011. Fresh-cut fruit and vegetables: New trends, methods and impacts. In J. M. McMann (Ed.), *Potable Water and Sanitation* Hauppauge. New York, USA: Nova Science Publishers. 1–36.
- [5] Ibañez, F.C. 2001. Parámetros y medidas en el análisis sensorial. En: F.C. Ibañez Moya y Y. Barcina (Ed.), *Análisis sensorial de alimentos*. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica. 49-61.
- [6] Regulation EC 1441/2007. 2007. Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L. 322, 12–29.

Tablas y Figuras

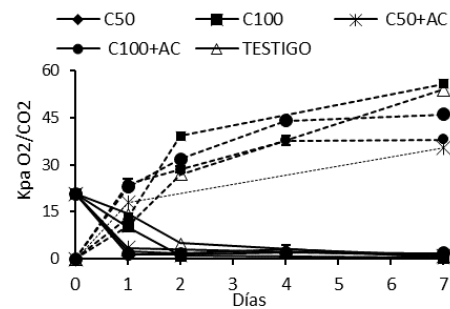


Figura 1. Evolución de la atmósfera en el interior de las bolsas de habas “Muchamiel” durante 7 días y 3°C bajo distintos tratamientos de lavado. Las líneas continuas representan los kPa de O₂ mientras que las discontinuas representan CO₂.

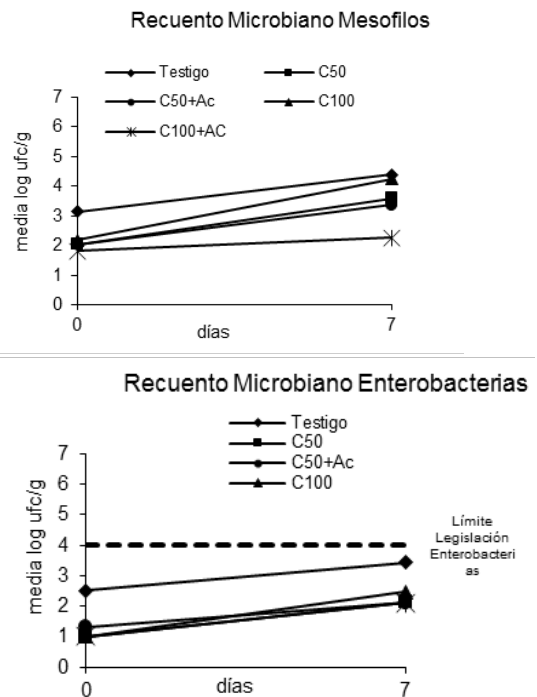


Figura 2. Recuento microbiano de microorganismos mesófilos y enterobacterias en semillas de habas “Muchamiel” procesadas en fresco bajo distintos tratamientos y conservadas 7 días a 3°C.

Tabla 1. Concentración de etileno (ppm) a 3°C.

Testigo	C50	C100	C50+AC	C100+AC	
Día1	0,07	0,18	0,13	0,08	0,22
Día3	0,25	0,12	0,07	0,10	0,20
Día7	0,14	0,20	0,06	0,07	0,06

Tabla 2. Evolución del sabor y el olor en semillas de habas "Muchamiel" tras 7 días a 3°C.

Tratamientos	Sabor	Olor
Inicial	8a	8a
Tras 7 días a 3°C		
Testigo	7c	6c
C50	7c	6c
C50 + AC	7c	6c
C100	7c	6c
C100 + AC	7,5b	6,5b

Escala de puntuación organoléptica: 1: extremadamente desagradable; 3: desagradable; 5: moderado; 7: bueno y 9: excelente

^z Las letras minúsculas comparan diferencias significativas entre los tratamientos y el valor inicial tras el periodo de conservación frigorífica ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de rango múltiple LSD

Discrimination of volatile compounds at harvest in melon identified by SPME and GC-MS

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

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

Instituto de Biotecnología Vegetal, CMN, UPCT, Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n, E-30202 Cartagena, Murcia, España. lact0@alu.upct.es

Resumen

El melón (*Cucumis melo* L.), planta modelo para la caracterización genómica y estudios de calidad. Empleada para realizar el cruzamiento de los dos cultivares de melón no climatéricos “Piel de Sapo” (PS) con el cultivar coreano “Shongwan Charmi-PI 161375”, obteniendo una población de líneas casi isogénicas (NILs), de la cual hace parte la NIL climatérica SC3-5-1 con introgresión en el grupo del ligamento III y VI empleada para estudiar la calidad a nivel de aromas, mediante la técnica de microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HP-SPME) acoplado al cromatógrafo de gases masas. Los grupos de aromas de tipo éster y azufrados obtenidos en la NIL en la recolección presentaron una mayor concentración total comparada con el parental PS, en las dos campañas evaluadas. Contrario al parental PS que presentó en la primera campaña mayor concentración en el grupo de aldehídos. Las diferencias en grupos de compuestos aromáticos observadas se asociaron al genotipo y en menor medida a las diferentes condiciones ambientales del cultivo en cada una de las campañas.

Palabras clave: Aromas volátiles; análisis de componentes principales, climaterio; *Cucumis melo* L.

Abstract

The melon (*Cucumis melo* L.), is a model plant for genomics characterization and quality studies. Two melon cultivars were used for breeding of cultivars of non-climacteric melon ‘Piel de Sapo’ (PS) with Korean cultivar ‘Shongwan Charmi-PI 161375’ obtaining a population of nearly isogenic line (NILs), which is part of the NIL climacteric SC3-5-1 with introgressions linkage groups III and VI. In this study, the quality characteristics of the aroma volatiles were identified using headspace solid phase microextraction (HP-SPME) coupled Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). The groups of esters and sulfurs type volatiles obtained for NIL SC3-5-1 shown a higher total concentration as compared with the parental PS in the two seasons evaluated while for PS presented higher concentration values of aldehydes. The main differences in groups of aromatic compounds were associated with the genotype and to a lesser extent to the different environmental conditions affecting the crop per season

Palabras clave: Aromas volatile; principal component analysis, genotype; *Cucumis melo* L.

1. Introducción

La colección de líneas casi isogénicas (NILs) de melón (*Cucumis melo* L.) ha sido importante base para contar actualmente con la secuencia completa del genoma del melón [1]. También lo ha sido para determinar QTLs asociados a parámetros de calidad instrumental (dureza, color, composición, aromas en la recolección o senescencia) y su climaterio [2–4].

Los diferentes fenotipos encontrados en estudios de perfiles aromáticos han ayudado a su asociación con las diferencias moleculares responsables de las diferencias reguladas por la síntesis de etileno, la cual provoca cambios en el aroma del melón [5, 6]. La producción de los compuestos volátiles depende de diversas

reacciones biosintéticas y de degradación en la que median diferentes enzimas. Algunas de estas rutas están muy asociadas al estado de madurez del fruto dado que en determinados puntos se activan y producen una mayor biosíntesis de los volátiles [7].

Diversas medidas de aromas en melón se han empleado para la descripción cualitativa y cuantitativa durante la maduración, diferencias en climaterio [8, 9], describiéndose como base más de 250 compuestos de aromas [10] agrupados en el fenotipo climatérico el predominio de ésteres [8] y derivados de azufrados [11]. En variedades no climatéricas en su mayoría presencia de compuestos saturados,

no saturados (alcoholes y aldehídos) y ésteres generalmente a niveles bajos o ausentes [8].

Para evaluar estas combinaciones únicas y la calidad global del fruto han estudiado previamente las características de las NILs de melón y los QTLs (*Quantitative trait loci*) implicados en las diferencias del carácter aromático [12].

En este estudio se tiene como objetivo comprobar que la calidad de volátiles evaluada a partir de la técnica de micro extracción de fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas (GC-MS) permite la caracterización del efecto del genotipo, viendo además el posible efecto de las diferencias agroecológicas entre dos campañas entre una línea casi isogénicas climática SC3-5-1 y su parental control no climático “Piel de Sapo” (PS).

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal

Frutos de melón (*Cucumis melo* L.) cultivar español T111, grupo *Inodorus*, del tipo 'Piel de Sapo' (PS), con comportamiento no climático, y la NIL con comportamiento climático SC3-5-1 [13] fueron cultivados en dos consecutivas campañas. Se utilizaron las siguientes réplicas (*n*) para cada una de las campañas: PS (*n*= 21; 13) y SC3-5-1 (*n*=8; 9). Las plantas se cultivaron en el centro de investigación y experiencias agrarias CIFEA (Torre Pacheco, Murcia), y los frutos se recolectaron según los índices de recolección descritos en Obando-Ulloa et al. [14].

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

Se prepararon muestras de zumo para el análisis de aromas a partir de cilindros de pulpa de la zona ecuatorial de los frutos de melón. Tras extraer y filtrar el zumo, se añadió una mezcla de solución saturada de CaCl₂ al 28.5% para evitar reacciones enzimáticas en el zumo extraído y se congeló el mismo (Obando-Ulloa et al. [14]). Con zumo descongelado se extrajeron los volátiles mediante microextracción en fase sólida el análisis de GC-MS descrito en Amaro et al. [15]. La identificación de los espectros se realizó de manera comparativa con la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST05a.L) [16]. Los aromas identificados fueron validados mediante el cálculo del índice de retención lineal (LRI) inyectando una serie de *n*-alcanos (C₆-C₂₀)

con el mismo método de análisis. La clasificación de los compuestos volátiles se agrupa de acuerdo a la estructura química [17].

2.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico primero se seleccionaron los compuestos volátiles individuales con una presencia mayor al 25% en frutos y mayor al 50% del total de réplicas evaluadas [17].

Posterior a la selección se realiza el análisis univariante aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el análisis de componentes principales (PCA), para observar las diferencias entre PS y NIL en cada campaña. La cuantificación de los volátiles se basa en la relación entre áreas de compuestos y la de 2-feniletanol como estándar interno (S.I.).

3. Resultados y Discusión

Las diferencias significativas de aroma entre el parental PS no climático y la NIL climática se observaron mediante PCA especialmente con la primera componente, que explicaron en las respectivas campañas el 62.7 y 61.2% de la varianza (Fig. 1). Las propias diferencias de comportamiento fisiológico están asociadas a las diferencias encontradas, con bajo contenido de volátiles (Fig. 2) o ausencia de ciertos compuestos en PS respecto a la NIL, mucho más diversa. Estas diferencias se asocian a las diversas reacciones de las rutas metabólicas de biosíntesis de los volátiles [7] como es el caso del grupo de los ésteres, que en la NIL SC3-5-1 presentó en ambas campañas mayor concentración total (ng.mL⁻¹) de ésteres acetato (37.5; 32.5), ésteres no acetato (5.5; 4.0) y compuestos azufrados la mayoría de tipo éster (5.7; 3.5), respectivamente (Fig. 2). Algunos de estos derivados azufrados proceden de aminoácidos como la metionina, aminoácido azufrado asociado a la biosíntesis de etileno del fruto (3).

La producción de volátiles total en el parental no climático fue menor; sin embargo el contenido de aldehídos (2,3 ng.mL⁻¹) fue mayor que la NIL en ambas campañas (Fig. 2) debido a que estos volátiles se caracterizan por sus notas verdes y están asociados a frutos inmaduros o no-climáticos donde no se produce tal nivel de conversión de aldehídos a alcoholes y ésteres [8].

Al comparar las campañas se presentaron diferencias en concentración para la NIL en los diferentes grupos de compuestos como se vio anteriormente. Pero quizás afectó más al

parental PS la diferencia, con una mayor concentración de ésteres acetato ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en la segunda respecto a la primera campaña. Ello se correlaciona bien con la tendencia opuesta en aldehídos que fue menor en la segunda campaña ($0.9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) respecto a la primera. La respuesta de los frutos posiblemente atribuida a las diferencias en maduración provocadas por diferencias ambientales en los diferentes años [17]. Es pertinente evaluar pues en detalle identificar las diferencias cuantitativas de aromas individuales.

4. Conclusiones

Las diferencias genotípicas en el melón influyeron dramáticamente en el aroma del melón siendo notablemente mayor las concentraciones en la NIL climatérica respecto al parental no climatérico. Aunque las proporciones de los principales grupos de compuestos se mantuvieron, las condiciones de ambientales en cada campaña influyeron en la concentración del aroma del fruto.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] Garcia-Mas J., Benjak A., Sanseverino W., Bourgeois M., Mir G., González V. M., Hénaff E., Câmara F., Cozzuto L., Lowy E., Alioto T., Capella-Gutiérrez S., Blanca J., Cañizares J., Ziarsolo P., Gonzalez-Ibeas D., Rodríguez-Moreno L., Droege M., Du L., Alvarez-Tejado M., Lorente-Galdos B., Melé M., Yang L., Weng Y., Navarro A., Marques-Bonet T., Aranda M., Nuez F., Picó B., Gabaldón T., et al. 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 109: 11872–7.
- [2] Tijssens L. M. M., Dos-Santos N., Jowkar M. M., Obando-Ulloa J. M., Moreno E., Schouten R. E., Monforte A. J., Fernández-Trujillo J. P. 2009. Postharvest firmness behaviour of near-isogenic lines of melon. Postharvest Biol. Technol. 51: 320–326.
- [3] Dos-Santos N., Jimenez-Araujo A., Rodriguez-Arcos R., Fernandez-Trujillo J. P. 2011. Cell wall polysaccharides of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.) and their inbred parentals which show differential flesh firmness or physiological behavior. J. Agric. Food Chem. 59: 7773–84.
- [4] Fernández-Trujillo J. P., Obando J., Martínez J. A., Alarcón A., Eduardo I., Arús P., Monforte A. J. 2005. Gestión de la calidad de experimentos con frutos de una colección de líneas casi isogénicas de melón. III Virtual Iberoamer Cong Qual Lab Manag Madrid, Spain: 149–158.
- [5] Ayub R., Guis M., Ben Amor M., Gillot L., Roustan J. P., Latché A., Bouzayen M., Pech J. C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. Nat. Biotechnol. 14: 862–6.
- [6] Flores F., Romojaro F., Ben Amor M., Pech J. C., Latché A. 2001. Differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways of ethylene-suppressed cantaloupe melons. Acta Hortic. 553: 151–153.
- [7] Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. Plant J. 54: 712–732.
- [8] Obando-Ulloa J. M., Moreno E., García-Mas J., Nicolai B., Lammertyn J., Monforte A. J., Fernández-Trujillo J. P. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit. Postharvest Biol. Technol. 49: 27–37.
- [9] Verzera A., Dima G., Tripodi G., Conurso C., Crinò P., Romano D., Mazzaglia A., Lanza C. M., Restuccia C., Paratore A. 2014. Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* var. *inodorus* H. Jacq.) in relation to different rootstocks. Sci. Hortic. 169: 118–124.
- [10] Beaulieu J. C., Grimm C. C. 2001. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. J. Agric. Food Chem. 49: 1345–1352.
- [11] Gonda I., Lev S., Bar E., Sikron N., Portnoy V., Davidovich-Rikanati R., Burger J., Schaffer A. A., Tadmor Y., Giovannonni J. J. 2013. Catabolism of L-methionine in the formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. Plant J. 74: 458–472.
- [12] Obando-Ulloa J. M., Ruiz J., Monforte A. J., Fernández-Trujillo J. P. 2010. Aroma profile of a

collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.). Food Chem. 118: 815–822.

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

[14] Obando-Ulloa J. M., Jowkar M. M., Moreno E., Souri M. K., Dos-Santos N., Sanmartin P., Bueso M. C., Kessler M., Martinez J. A., Alarcon A., Nicolai B., Lammertyn J., Garcia-Mas J., Monforte A. J., Fernández-Trujillo J. P. 2008. Near-isogenic lines of melon with different climacteric behavior as a tool to characterize fruit senescence traits. Cucurbitaceae 2008 Proc IXth Eucarpia Meet Genet. Breed. Cucurbitaceae, pp. 109–113.

[15] Amaro A. L., Fundo J. F., Oliveira A., Beaulieu J. C., Fernández-Trujillo J.P., Almeida D. P. F. 2013. 1-methylcyclopropene effects on temporal changes of aroma volatiles and phytochemicals of fresh-cut cantaloupe. J. Sci. Food Agric. 93:828–837.

[16] National Institute of Standards and Technology [http://www.nist.gov/]

[17] Dos-Santos N., Bueso M. C., Fernández-Trujillo J. P. 2013. Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. Food Res. Int. 54:1801–1812.

Figuras

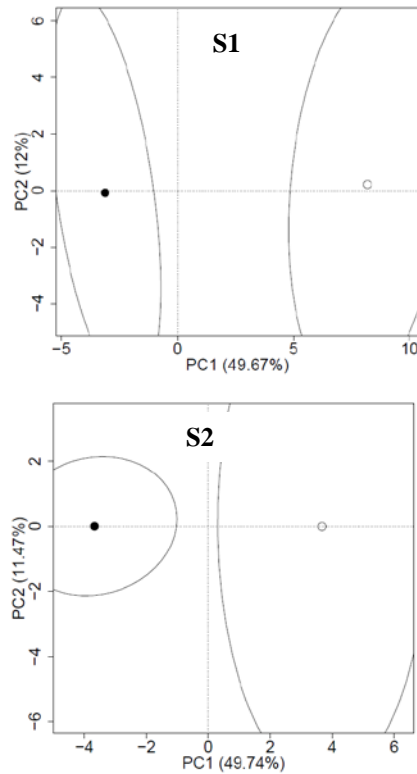


Figura 1. Análisis de componentes principales (centroides correspondientes al 95% intervalo de confianza) partiendo de los grupos de aromas volátiles principales en zumo de melón (*Cucumis melo* L.) en recolección provenientes del parental cultivar español T111 tipo 'Piel de Sapo' (PS, ●) y la línea casi isogénica (NIL SC3-5-1, ○) en dos campañas sucesivas (S1 y S2).

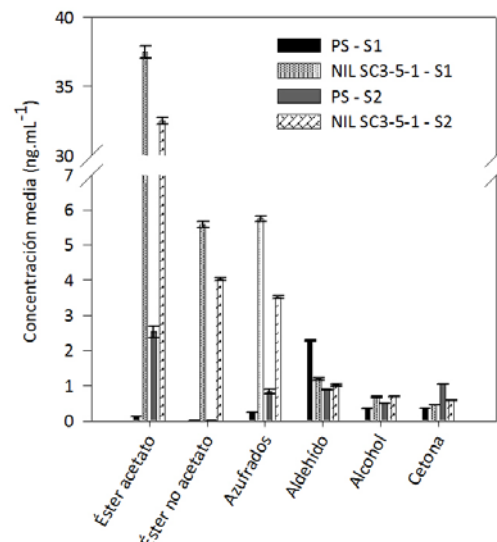


Fig. 2. Grupo de volátiles mayoritarios en el zumo de melón (*Cucumis melo* L.) del parental cultivar español T111 tipo 'Piel de Sapo' (PS) y la línea casi isogénica (NIL SC3-5-1) en dos campañas sucesivas (S1 y S2).

Sodium acidified chlorite and ozonated water as alternative sanitizing techniques for minimally processed broccoli

J. Navarro-Rico⁽¹⁾, G.B. Martínez-Hernández^(1,2), P. Gómez⁽²⁾, F. Artés^(1,2),
F. Artés-Hernández^(1,2)

⁽¹⁾ Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia, España. E-mail: javiernavarrorico@gmail.com

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

Resumen

Se estudió el efecto de la desinfección con clorito sódico acidificado (CSA) (300 ppm) y agua ozonizada (O₃) (0,6-0,7 ppm), individual o combinado, como alternativa a la desinfección con 100 ppm hipoclorito sódico (NaClO), sobre la calidad de dos variedades de brócoli ('Bimi' y 'Parthenon') mínimamente procesadas en fresco (MPF) durante 15 días a 4 °C. Un lavado con agua corriente a 4 °C fue considerado como control. Se estudió la evolución de la microflora alterante (aerobios mesófilos totales, enterobacterias, hongos y levaduras) y del contenido en compuestos bioactivos (capacidad antioxidante total, contenido en polifenoles totales, contenido de clorofilas y carotenos) durante la vida comercial. No se observaron diferencias en los principales géneros de microflora alterante entre los tratamientos alternativos y el NaClO ni en el día de procesado ni durante la vida comercial. Se produjo un aumento de la capacidad antioxidante total y del contenido de clorofilas y carotenos totales en ambas variedades durante la vida útil. El contenido de polifenoles totales se mantuvo constante durante los 15 días a 4 °C. Como conclusión principal, una desinfección combinada de CSA + O₃ mantuvo la calidad del brócoli MPF obteniendo valores similares al NaClO en todos los parámetros estudiados.

Palabras clave: IV Gama; "Parthenon"; *Brassica oleracea*, Grupo Italica x Grupo Alboglabra; Capacidad antioxidante total;

Abstract

The effect of sanitizing with acidified sodium chlorite (ASC) (300 ppm) and ozonated water (O₃) (0.6-0.7 ppm), along or combined, as an alternative to 100 ppm sodium hypochlorite (NaClO) on the quality during 15 days at 4 °C of shelf-life of two minimally processed broccoli cvs. ('Bimi' and 'Parthenon') was studied. Washing with cold tap water (4 °C) was used as control. The microbial quality (enterobacteria, mesophilic, yeasts and moulds) and the bioactive content (total antioxidant capacity, total phenolic content and chlorophyll and carotene content) were determined. There were no differences on the microbial load between treatments on the processing day and during the shelf-life. An increase in the total antioxidant capacity and in the chlorophyll and carotene content was shown after 15 days at 4 °C. The total phenolics content did not change during the shelf life in both cvs. As main conclusion, a disinfection with a combination of CSA + O₃ was effective for disinfect both varieties of FC broccoli showing similar results to NaClO in the studied parameters.

Keywords: Fresh-cut; 'Parthenon'; *Brassica oleracea*, Italica Group x Alboglabra Group; Total antioxidant capacity;

1. Introducción

El NaClO es el desinfectante más empleado en las industrias de productos MPF, ya que presenta un elevado poder desinfectante a un coste bajo. En los últimos años, han surgido problemas, ya que puede provocar la oxidación de compuestos presentes en los alimentos, formando productos potencialmente perjudiciales tanto para el ser humano como para el medio ambiente, como el CHCl₃, o ciertos trihalometanos, que pueden

causar cánceres en el hígado o en los riñones [1]. Así mismo, a pH elevados puede reaccionar con la materia orgánica presente en el agua de lavado produciendo cloraminas, por estas razones se ha prohibido su utilización en diversos países de la Unión Europea [2].

Por esto, las industrias de productos MPF necesitan nuevos desinfectantes que puedan ser una alternativa eficaz al NaClO, y minimicen perjuicios al medio ambiente y al ser humano. Se

ha demostrado que el clorito sódico acidificado (CSA) o el agua ozonizada son desinfectantes que pueden reunir esas características [2,3].

El Bimi es un nuevo híbrido natural entre el brócoli chino o kailan (*B. oleracea*, Grupo Alboglabra) y el convencional (*B. oleracea*, Grupo Italica). Tiene un tallo fino y alargado con un pequeño florete al final del mismo. Por su morfología, sabor y la posibilidad de que se pueda comer entero sin desechar ninguna de sus partes, es un producto idóneo para el procesamiento mínimo en fresco [4].

En el presente trabajo se estudió el efecto del empleo de varios desinfectantes alternativos al NaClO, como el CSA y el agua ozonizada, así como la combinación de ambos tratamientos sobre la calidad durante la vida útil de dos variedades de brócoli mínimamente procesado en fresco.

2. Materiales y Métodos

El brócoli Parthenon y el Bimi fueron proporcionados por la Cooperativa Agrícola de Producción Sacoje (La Hoya, Lorca, Murcia). Una vez recolectado, el producto fue trasladado con hielo picado en la superficie a la planta piloto del Grupo de Postrecolección y Refrigeración de la Universidad Politécnica de Cartagena y almacenado a 0 °C en condiciones de oscuridad hasta el momento del procesamiento. El material vegetal fue seleccionado en un estado de madurez uniforme y desprovisto de hojas. Los floretes de brócoli Bimi se cortaron con un tamaño uniforme de 15-18 cm. Las cabezas de 'Parthenon' se cortaron con un cuchillo afilado, dejando sólo los floretes.

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: 1) Control: el brócoli fue lavado (2 min) con agua corriente a 5 °C. 2) Lavado con NaClO (100 ppm; pH= 6,5; 5 °C; 2 min) seguido de un enjuagado con agua corriente a 5 °C durante 1 min. 3) Clorito sódico acidificado (CSA): Lavado con una solución de CSA (300 ppm; 5 °C; 2 min) acidificado mediante la adición de ácido cítrico hasta alcanzar un pH: 2,8, seguido de un enjuagado con agua corriente durante 1 min. 4) O₃: ducha con agua ozonizada (5°C; 3 min; 0,6 ppm O₃; ORP 950 mV) seguida de enjuague en agua corriente a 5°C durante 1 min. 5) CSA+O₃: lavado idéntico al del tratamiento CSA, seguido de ducha con agua ozonizada (5°C; 3 min; 0,6 ppm O₃; ORP 950 mV) tras la que se efectuó un enjuague en agua corriente a 5 °C durante 1 min.

Una vez aplicados los tratamientos, 200 g de brócoli se situaron en barquetas de polipropileno rígido (PP) de 2 L de capacidad para la variedad

Parthenon y de 1,5 L para la variedad Bimi. Las barquetas se termosellaron con un film de PP de 30 µm de espesor. Una vez envasado, se conservaron a 4±1 °C en oscuridad. Los análisis se llevaron a cabo los días 0, 5, 9 y 15 de conservación bajo simulación de vida útil.

2.1 Análisis microbiológicos

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

2.2 Contenido en polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (CPT) se analizó por el método Folin-Ciocalteu con ligeras modificaciones realizadas por Navarro-Rico [5]. Los resultados se expresaron en mg ac. gálico / 100 g pf. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

2.3 Capacidad antioxidante total

La CAT se analizó por tres métodos, por DPPH, FRAP, ABTS siguiendo las indicaciones realizadas anteriormente por Navarro-Rico [5]. La CAT se expresó como mg trolox eq. / 100 g de pf. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

2.4 Contenido de clorofilas y carotenos totales

Para determinar el contenido en clorofilas totales (CCT) y carotenos totales (CTC) se siguió el método llevado a cabo por Martínez-Hernández [4]. Los resultados fueron expresados en mg / kg pf. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

3. Resultados y Discusión

La atmósfera de equilibrio fue de 9-17 kPa CO₂ + 4-9 kPa O₂ para ambas variedades, sin diferencias entre los desinfectantes ni entre las variedades. Estas presiones parciales son similares a las presentadas por otros autores para las mismas variedades [5,6].

3.1 Análisis microbiológicos

En el día de procesamiento, por lo general, todos los tratamientos lograron reducir la carga microbiana de los tres grupos microbianos estudiados en brócoli Parthenon, sin diferencias significativas entre los desinfectantes empleados con el control ni con NaClO (Fig 1.). La variedad Bimi presentó cargas microbianas más elevadas en el día de procesamiento (4,5-5,9 log UFC g⁻¹) que la Parthenon (3,8-4,5 log UFC g⁻¹) aunque las reducciones microbianas conseguidas con la

aplicación de los desinfectantes fueron más elevadas. Por lo general, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el NaClO. Estas cargas microbianas iniciales son ligeramente superiores a las encontradas por Martínez-Hernández [6] para ambos cvs. de brócoli, aunque similares a las encontradas por Navarro-Rico [4] en dichos cvs. sometidos a una desinfección con distintos tipos de agua electrolizada.

Tras 15 días a 4 °C, todos los tratamientos desinfectantes aplicados se acercaron al efecto del NaClO en la carga microbiana del brócoli Parthenon de los grupos de microorganismos analizados, mejorando los resultados en el caso de HL. Como sucedió en el día de conservación, la carga microbiana del 'Bimi' fue más elevada que la de Parthenon tras 15 días a 4 °C. El CSA fue el único tratamiento que controló el crecimiento microbiano de E y APT, si bien en el resto de tratamientos no se observaron diferencias significativas con el NaClO. Estos resultados son similares a los encontrados por Tomás-Callejas [7] en mini hojas de tatsoi donde el CSA controló la población microbiana sin diferencias con el NaClO.

3.2 Contenido en polifenoles totales

Tras 15 días a 4 °C, se mantuvo el CPT de las dos variedades de brócoli para todos los tratamientos desinfectantes aplicados, sin diferencias significativas con el control o con NaClO (Fig. 3). Este hecho muestra como el envasado en AM ralentizó la acción de las enzimas responsables de la oxidación de fenoles tal y como sucedió en un estudio de vida útil elaborado sobre las mismas variedades de brócoli MPF [5].

3.3 Capacidad antioxidante total

Todos los tratamientos desinfectantes provocaron un aumento de la CAT respecto del control para ambas variedades (Fig. 2). Por lo general, no se apreciaron diferencias significativas entre los desinfectantes alternativos y el NaClO, pero sí con el control. Estos valores están en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores [5,6].

3.4 Contenido de clorofilas y carotenos totales

En general, todos los tratamientos desinfectantes utilizados, a excepción del O₃, presentaron un CCT igual o superior al control y NaClO, en el día de procesado para ambas variedades MPF. Los valores en el día de procesado fueron ligeramente superiores a los

encontrados por otros autores (Fig. 4) [6]. Únicamente los tratamientos en los que se empleaba el O₃ mantuvieron el CCT tras 15 días a 4 °C. El resto de tratamientos, aunque mostraron un descenso de su CCT respecto del valor inicial, no mostraron diferencias significativas con el NaClO para ambas variedades. Estos descensos del CCT coinciden con los observados por otros autores para variedades convencionales de brócoli almacenados en refrigeración [8]. El nuevo híbrido Bimi mostró mayor CCT y mayor CTC que la variedad convencional Parthenon a lo largo de toda la conservación. El CTC se comportó de manera muy similar al CCT para ambos cvs. de brócoli.

4. Conclusiones

Como conclusión general, tanto la desinfección con CSA como con la combinación de CSA + O₃, unido a un envasado en AM y una vida comercial a 4 °C durante 15 días, preservó la calidad en brócoli Parthenon y Bimi MPF de manera similar a lo acontecido para un tratamiento convencional con NaClO, mostrándose ambas como buenas alternativas desinfectantes.

5. Agradecimientos

A la empresa SAKATA SEEDS IBÉRICA S.L.U. por la financiación, y a la Cooperativa Agrícola de Producción SACOJE por proveer el material vegetal.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Hruđey, S. E., 2009. Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. *Water Res.* 43: 2057–2092.
- [2] Artés, F., Gómez, P.A., Aguayo, E., Escalona, V. H., Artés-Hernández, F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 287–296.
- [3] Silveira, A.C., Aguayo, E., Artés, F. 2010. Emerging sanitizers and Clean Room packaging for improving the microbial quality of fresh-cut Galia melon. *Food Control.* 21: 863-871.
- [4] Martínez-Hernández, G.B., Gomez, P., Pradas, I., Artés, F., Artés-Hernández, F. 2011. Moderate UV-C pretreatment as a quality enhancement tool in fresh-cut Bimi broccoli. *Post Biol Technol.* 62: 327-337.
- [5] Navarro-Rico J., Artés-Hernández F., Gómez P., Nuñez-Sánchez M.A., Artés F., Martínez-Hernández G.B. 2014. Neutral and acidic electrolysed water microbial quality and health promoting compounds of fresh-cut broccoli

throughout the shelf life. *Innovative Food Sci Emerg Technol.*: 21, 74-81.

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

[7] Tomás-Callejas A., Artés F., López-Velasco, G., Artés-Hernández F. 2012. Acidified sodium chlorite optimization assessment to improve quality of fresh-cut tatsoi baby leaves. *J Sci Food Agric.* 92: 877-885.

[8] Nath, A., Bagchi, B., Misra, L. K., Deka, B. C. 2011. Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage. *Food Chem.* 127: 1510-1514.

Tablas y Figuras

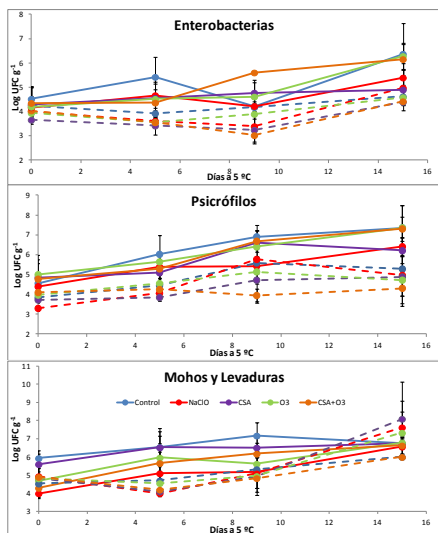


Figura 1. Cambios en AMT, E, HL (log UFC g⁻¹) de brócoli 'Parthenon' (línea discontinua) y 'Bimi' (línea continua) MPF durante 15 días a 4°C.

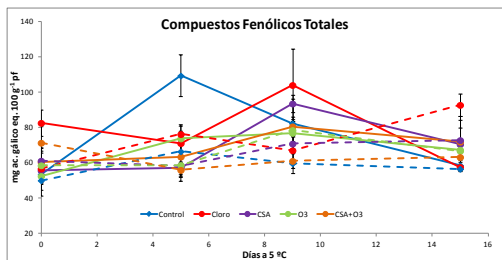


Figura 3. Evolución del CPT (mg ac. gálico 100 g⁻¹ pf) de brócoli 'Parthenon' (línea discontinua) y 'Bimi' (línea continua) MPF durante 15 días a 4°C.

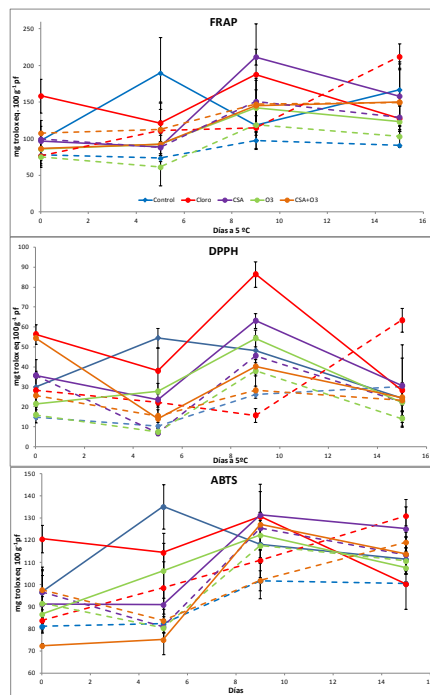


Figura 2. Evolución de la CAT por los métodos FRAP, DPPH y ABTS (mg trolox eq. 100 g⁻¹ pf) de brócoli 'Parthenon' (línea discontinua) y 'Bimi' (línea continua) MPF durante 15 días a 4°C.

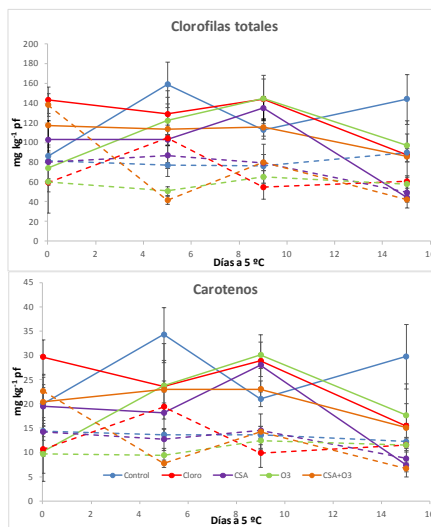


Figura 4. Evolución del CCT y CTC (mg kg⁻¹ pf) de brócoli 'Parthenon' (línea discontinua) y 'Bimi' (línea continua) MPF durante 15 días a 4°C.



ORAL SESSION II
Agrifood Biotechnology

"Itumthirteen" & "Itumfourteen": a bet on the Muscat grape flavor

M. Tornel⁽¹⁾, J. Carreño⁽²⁾

⁽¹⁾ IMIDA, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, C/ Mayor, s/n, 30150 La Alberca - Murcia manuel.tornel@carm.es

⁽²⁾ SNFL, Special New Fruit Licensing Ltd.

Resumen

Ante la aparición de las primeras variedades de uva de mesa apirenas, el Departamento de Viticultura del IMIDA comenzó su programa de obtención de nuevas variedades en 1991, usando principalmente variedades locales de la Región de Murcia. En el año 2002 se crea la empresa ITUM, S.L., Investigación y Tecnología en Uva de Mesa, constituida por la mayoría de productores de uva de mesa de la región de Murcia (España). El convenio entre ITUM e IMIDA da un gran impulso al programa de mejora, siendo el principal objetivo el desarrollo de nuevas variedades de uva de mesa apirenas con buena calidad para el consumidor y económicamente rentables para el productor y el mercado. Resultado de esta colaboración son las 14 variedades registradas, destacan por la textura crujiente que presentan las bayas y que ninguna requiere poda manual de racimos. Los productores socios de ITUM han plantado más de 350 Ha en los 3 años que llevan registradas las variedades. En el año 2012 se registraron 12 variedades. A finales del pasado 2014 se registraron dos nuevas variedades, que además de ser uvas apirenas con textura crujiente presentan sabor moscatel, Itumthirteen e Itumfourteen, para satisfacer la tendencia actual de los mercados, cada vez más exigentes en cuanto a frutas con aroma y sabor que atraiga a los consumidores. Ambas de media estación en lo que a maduración se refiere, Itumthirteen tiene bayas blancas de pulpa jugosa, mientras que Itumfourteen destaca por su color rojo vivo. En cuanto a la difusión mundial de las variedades, se envió material vegetal en cultivo "in vitro" a Chile para su comercialización en Sudamérica, y a Sudáfrica para su venta en Sudáfrica y Namibia; el presente año se envió material vegetal para su explotación en Australia.

Palabras clave: *Vitis vinifera*; apirena; textura; crujiente.

Abstract

With the emergence of the first varieties of seedless table grape, the Department of Viticulture IMIDA began breeding program new varieties in 1991, its main source of local varieties of the Murcia region. In 2002 the company ITUM, SL, Research and Technology in Table Grape, made by most producers of table grapes in the region of Murcia (Spain) is created. The agreement between ITUM and IMIDA gives a boost to the improvement program, the main objective the development of new varieties of seedless table grape quality for the consumer and economically profitable for the producer and the market. Result of this collaboration are the 14 varieties registered, stand out the crunchy texture having berries and none requires manual pruning clusters. ITUM partners producers have planted more than 350 hectares in the three years leading registered varieties. In 2012, twelve varieties were register. Late last 2014 two new varieties, in addition to being seedless grapes with crunchy have muscat flavor, Itumthirteen and Itumfourteen, to meet current market trends increasingly demanding about fruit aroma and flavor were recorded that attract consumers. Midseason both as relates to maturation, has white berries Itumthirteen juicy flesh, while Itumfourteen noted for its bright red. As for the global spread of varieties, plant material was sent "in vitro" to Chile for marketing in South America and South Africa for sale in RSA and Namibia cultivation; this year plant material was sent for exploitation in Australia.

Keywords: *Vitis vinifera*; seedless; texture; crunchy.

1. Introducción

España es uno de los principales productores de uva de mesa en Europa, segundo tras Italia y el decimoprimer del mundo; Murcia es la primera región a nivel nacional productora de uva de mesa, con una producción que superó las 145 mil toneladas en 2013, siendo además una de la regiones pioneras en la producción de uvas

apirenas; en la actualidad más del 70% de las variedades cultivadas en la Región son variedades sin semillas, exportándose principalmente a Reino Unido y Alemania.

El cultivo de uva de mesa en la Región de Murcia es en regadío, con una superficie que supera las 5.000 Ha. La producción de uva de mesa se ha centrado tradicionalmente en variedades con

semilla autóctonas españolas (Aledo, Napoleón, Dominga, Ohanes) o de otros países (Italia, Cardinal, Red Globe). Desde hace 20 años, y debido a la gran demanda en los mercados de las variedades apirenas se ha producido un cambio en las variedades cultivadas, incrementándose el cultivo de variedades apirenas como Superior, Crimson, Autumn Royal y Princess. En los últimos 8 años se están plantando otras nuevas variedades de diferentes programas de mejora como SNFL, SunWorld, IFG, ARRA y el de ITUM.

Por ello el equipo de uva de mesa del IMIDA en los años 1989-90 puso a punto las técnicas de realización de cruzamientos, cultivo “*in vitro*” de esbozos y posterior rescate embrionario, aclimatación de plántulas, realización de semilleros, cultivo en campo y evaluación de híbridos, para comenzar su programa de obtención de nuevas variedades de uva en 1991. En los primeros cruzamientos se utilizó como parental femenino las variedades autóctonas o de cultivo tradicional en nuestra región, que tienen semillas; y como parental masculino variedades apirenas; en este periodo se obtenían alrededor de 2.000 híbridos anualmente.

En 2002 se crea la empresa privada ITUM, S.L., Investigación y Tecnología en Uva de Mesa, constituida por la mayoría de productores de uva de mesa de la región de Murcia (España). ITUM e IMIDA comenzaron juntos un nuevo programa de mejora en 2003, siendo el principal objetivo el desarrollo de nuevas variedades con buena calidad para el consumidor y económicamente rentables para el productor y el mercado. Supuso un gran impulso al programa con la obtención de entre 10.000 y 15.000 híbridos anuales.

Como resultados de este proyecto en el año 2012 se registraron doce variedades de uva de mesa, de las que ya se han plantado más de 350 hectáreas en las explotaciones de los socios; las seis primeras, de Itumone a Itumsix son uvas blancas apirenas, de textura crujiente, y diferentes fechas de recolección, entre finales de julio y mitad de diciembre; las cuatro siguientes, de Itumseven a Itumten presentan bayas rojas sin semillas, pulpa muy crujiente, sabores neutro ácido y maduración desde agosto a noviembre; Itumeleven, única variedad registrada con semillas, pulpa crocante y color negro; itumtwelve, uva apirena negra de sabor neutro ácido con bayas muy crujientes.

A finales de 2014 se han registrado otras dos nuevas variedades, que destacan por su sabor moscatel, para satisfacer la actual demanda de

los consumidores: “uva sin pepitas, crujiente y con sabor moscatel” (Sarasola, 2013).

2. Material y Métodos

Para la realización de nuestro programa de mejora empleamos el método de hibridación clásico mediante cruzamientos, consistente en emasculación de los racimos usados como parental femenino y polinización con el polen de la variedad seleccionada como parental masculino. Si el parental femenino tiene semillas, las extraemos y realizamos la siembra en sustrato; si por el contrario, el parental femenino presenta esbozos seminales o es apirena, se procederá a la extracción y cultivo “*in vitro*” de los esbozos seminales, procediendo después al rescate embrionario (Carreño, 2005).

Las plantas obtenidas fueron cultivadas en sistema de conducción de parral con riego por goteo y con las técnicas usuales de cultivo de uva de mesa.

Las principales características que debe tener una variedad de uva de mesa para su producción y comercialización con éxito en el contexto actual de producción y de exigencias del consumidor, son las que evaluamos de nuestros híbridos para su selección (OIV, 2001).

2.1 Sabor de las bayas

Existen variedades de uva de mesa con diferentes sabores que podemos clasificar en tres: neutro, moscatel y foxé. El sabor neutro es el sabor más extendido en las uvas y podemos definir como el sabor de aquellas uvas que no tienen sabor moscatel ni sabor foxé, pudiendo clasificarse en más o menos ácidas. El sabor foxé es algo intermedio entre sabor fresa y frambuesa, y proviene de variedades de *Vitis labrusca*, estando presente en nuevas variedades de uva de mesa apirenas de reciente comercialización. El sabor moscatel es atribuido a uvas con un aroma característico producido por compuestos terpénicos volátiles, muy apreciadas por los consumidores.

2.2 Textura o firmeza de la pulpa de las bayas

La pulpa de las bayas de uva puede ser blanda, media o crujiente. Las variedades con textura firme son muy apreciadas por el consumidor y además tienen ventajas durante el transporte y el proceso de comercialización.

La firmeza de la pulpa la calculamos con un analizador de textura de alimentos, midiendo la presión necesaria para deformar la baya un 20%

de su calibre, esto nos permite tener datos objetivos sobre la textura de las bayas de uva. Los valores obtenidos están directamente relacionados con las catas realizadas en campo.

2.3 Presencia o no de semillas, apirenia

En cuanto a la presencia o no de semillas en las bayas las variedades de uva de mesa se pueden clasificar en tres grupos: Uvas con semillas normales lignificadas de tamaño grande con un peso de entre 30 a 70 mg./semilla; variedades apirenas, presentan bayas con semillas muy pequeñas de color verde no lignificadas, no perceptibles al comerlas, tienen un tamaño inferior a 10 mg. de peso fresco, se denomina stenospermocárpica; apirenia partenocárpica con ausencia total de semillas, frutos desarrollados sin fecundación ocurre en algunas variedades de uva tipo Corinto.

2.4 Apariencia de racimos y bayas

Para el consumidor la apariencia, el aspecto de los racimos y bayas tiene que ser bueno tanto en la forma como en el color. La forma de la baya es un carácter genético. Las principales variedades cultivadas tienen bayas de forma esférica, elíptica corta, elíptica larga, o troncovoide. No parece que la forma de la baya sea determinante para su mayor o menor éxito comercial, aunque se suelen preferir bayas esféricas o elípticas. Genéticamente también existen diferentes formas de racimos, siendo los más cultivados de forma cónica.

2.5 Color de las bayas

Las diferentes variedades de uva de mesa se pueden agrupar en tres coloraciones distintas: blancas, rojas y negras. Las uvas blancas no producen antocianinas (Carreño, 1995). El color es un carácter genético. Independientemente del color de la uva, lo importante es que sea uniforme tanto dentro de las bayas, que no tengan zonas en la baya con diferente coloración, como entre las bayas del mismo racimo (Yakushiji, 2001).

2.6 Compacidad de racimos

Tanto el productor como el consumidor prefieren racimos de compacidad media, ya que si son excesivamente sueltos se reduce mucho la cosecha y con racimos muy compactos aumentan mucho los problemas fitosanitarios.

Aunque hay un componente genético en la compacidad de los racimos, diferentes técnicas agronómicas pueden influir en la diferente compacidad conseguida en el cultivo. En

variedades que suelen producir racimos algo o muy compactos se suelen usar tratamientos con ácido giberélico en floración para disminuir las tasas de cuajado y por tanto disminuir la compacidad de los racimos.

2.7 Tamaño de bayas

Las cadenas de comercialización exigen para cada variedad unos calibres mínimos, diámetro de la zona ecuatorial de la baya, que suelen ser superiores a 17 mm para variedades apirenas y de unos 20 mm para variedades con semillas.

2.8 Ausencia de problemas fisiológicos

Varios problemas de carácter fisiológico pueden alterar, a veces gravemente, la calidad y productividad de la uva de mesa; seleccionamos los híbridos que no presenten granillo, rajado, desgrane de bayas y baja productividad.

3. Resultados

A finales del pasado 2014 se registraron dos nuevas variedades como resultado del trabajo desarrollado dentro del convenio de colaboración entre IMIDA e ITUM, que se suman a las 12 registradas con anterioridad.

Los datos de época de recolección están referidos al hemisferio norte. Para tener una idea de la productividad de la variedad ofrecemos datos aproximados del índice de fertilidad (tabla 1) y del tamaño de racimos.

Itumthirteen: variedad de uva blanca apirena, destaca por su sabor moscatel ligero y textura muy crujiente; de media estación (final julio-mitad octubre), el inicio de recolección coincide con el fin de cosecha de Sugraone; el calibre de bayas oscila entre 17-19 mm, llegando a 22 mm con los tratamientos hormonales. Para raleo aplicamos dosis bajas de ácido giberélico, anillado y GA3 engorde a 7ppm. Productiva y buena resistencia a la lluvia y a la postcosecha.

Obtenida de un cruce realizado en el año 2008, con el código de obtentor 08-339-31, es el resultado de tres generaciones de cruzamientos; entre su linaje incluye variedades como Italia, Dominga, Emperador, Moscatuel, Calmeria y Moscatel de Alejandría.



Figura 1. Racimo de uva Itumthirteen

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

Variedad	Textura (N)	Índice Fertilidad
Itumthirteen	20-25	1-1,2
Itumfourteen	19-23	1,2-1,4

Itumfouteen: uva apirena con racimos de color rojo brillante, sabor moscatel ligero y buena acidez en plena maduración, bayas crujientes con un calibre entre 20-25 mm. Muy productiva con índice de fertilidad 1,2-1,4, al ser tan productiva se recomienda eliminar racimos débiles para homogeneizar la calidad. Periodo de recolección de mitad de agosto a mitad de octubre. Se puede cultivar sin aplicaciones de GA3 en floración o usar dosis muy bajas; tolera y responde bien a 2 aplicaciones para engorde de 7 ppm de GA3 y anillado.

Resultado de tres generaciones de cruzamientos y conocida con el código de obtentor 08-195-14, incluye entre sus parentales Crimson, Don Mariano, Superior y Princess.



Figura 2. Racimo de uva Itumfourteen

4. Conclusiones

Se amplía la oferta varietal a los productores de nuestra región con dos nuevas variedades de uva de mesa apirenas de textura crujiente y sabor moscatel, para satisfacer la demanda actual de los consumidores.

5. Referencias bibliográficas

- 2nd Edition of the OIV descriptor list for grape varieties and Vitis species. OIV 2001
- Carreño J., Martínez A., Almela L., Fernández-López J.A. 1995. Proposal of an index for the objective evaluation of the colour of red table grapes. Food Research Intl. 28: 373-377.
- Carreño, J.; Oncina, R.; Tornel, M.; Carreño, I. 2005. Obtención de nuevas variedades de uva de mesa mediante el cultivo "in vitro" de embriones. Optimización de la aclimatación de plantas. Agrícola Vergel. 283: p. 332-338
- Sarasola, B. 2013. VI Ed. Cata profesional de uvas y vinos. IMIDRA
- Yakushiji H., Sakurai N., Morinaga K. 2001. Changes in cell-wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. Physiologia Plantarum 111: 188-195.

Identification of DNA from *Antirrhinum linkianum* introgressed in *A. majus* with common molecular markers

V. Ruiz-Hernández^(1,2), J. Weiss^(1,2), M. Egea-Cortines^(1,2)

⁽¹⁾ Instituto de Biotecnología Vegetal. Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n. Campus Muralla del Mar, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, España

⁽²⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

Resumen

El género *Antirrhinum* se ha usado ampliamente en genómica comparativa. Actualmente, trabajamos en una Línea Recombinante Consanguínea (LRC) entre la conocida *A. majus* y *A. linkianum*. Por otra parte, contamos con una serie de marcadores que fueron desarrollados para identificar distintos *loci* de ambos parentales. Aquí mostramos una aplicación de éste conocimiento en nuestro trabajo diario.

Palabras clave: Indique 3 a 5 palabras clave separadas por punto y coma relacionadas con su trabajo (ninguna deberá estar en el título)

Abstract

The genre *Antirrhinum* has been widely used for comparative genomics. Currently, we are working on a Recombinant Inbred Line (RIL) between the well known *A. majus* and *A. linkianum*. On the other hand we count with a series of markers that were developed for identifying different *loci* from both parents. Here we show an application of this knowledge in our daily work.

Keywords: PCR, markers, *A. majus*

1. Introduction

Antirrhinum majus, popularly known as snapdragon, has been used as a model plant in genetics since the beginning of the 20th Century. The *Antirrhinum* species group also has been used in studies of natural variation. There are of approximately 20 species that are close relatives of *A. majus* and form a monophyletic group. This group is native to the Mediterranean region, mainly from southwestern Europe and northern Africa. The species vary widely in ecology and morphology [1].

All the species of *Antirrhinum* that have been studied can be cross-pollinated with one another and are able to form fertile hybrids, this facilitates the identification of genes that produce their differences [2]. Population genetic studies of *Antirrhinum* species have shown different geographic distributions, population sizes, and breeding systems, from self-fertility to obligate out-crossing [3]. This group share the same chromosome number ($2n=16$) and the majority of the species are allogamous, though commercial *A. majus* lines and a few other wild species can be self-fertilized [4].

From cultivars of *A. majus* some laboratory lines were produced and also exists a large collection of mutants [4]. A collection of *A. majus* mutants has been produced from some laboratory lines of *A. majus* which have been selected for high

transposon activity [5]. In some cases, these selected lines have been used to isolate genes by transposon tagging [6]. In addition, there is a collection of roughly four hundred classical mutants, mostly in an isogenic background (Sippe 50) [7].

Genetic recombination maps are an important source for comparative genomics because they allow identifying gene functions, assembling genome sequences and are useful also for breeding. Up to date, there are two molecular recombination maps published for *A. majus* (line 165E), both were made out of a F₂ cross line. The first one was made out of a cross between *A. majus* with the wild species *A. molle* [8]. The second one was published in 2010 [9] and it was carried out as result of a cross between *A. majus* (165E) x *A. majus* (Sippe 50). For allowing identification and alignment of linkage groups in the two populations, the genotypes from the first mapping population were used to construct the second map. Markers common to both maps permitted the identification of corresponding linkage groups and their orientations.

MITEs (miniature inverted-repeat transposable element) are present in relatively low copy-number in all *Antirrhinum* species. Due to the apparent inactivity of this transposon family, they have been called IDLE [10]. MITE transposons have commonly been found in gene-

rich regions [11], even though many transposon families are the main components of heterochromatin. This is consistent with the distribution observed by [9] of IDLE insertions in *Antirrhinum*, which are distributed among protein-coding genes and do not appear to be clustered in centromeric nor telomeric regions.

We have developed a Recombinant Inbred Line (RIL), between *A. majus* and its wild relative *A. linkianum*. Currently, we are working with the F₄ population and we are focused on a specific locus of the genome of the parents and their siblings. The aim of this work was to use different molecular sources to test the origin of our DNAs.

2. Materials and Methods

We used an inbred line from *A. majus*: 165E; and two different plants from *A. linkianum*^(1 and 2).

2.1 DNA extraction

DNA was extracted from young leaves, using the Macherey-Nagel kit “NucleoSpin® Plant II”, following the manufacturer protocol. We used 100mg of leaves, grinded with liquid nitrogen.

2.2 PCR

We used the high-fidelity polymerase: PrimeSTAR GXL DNA Polymerase. PCR conditions are specified in Table 1 and were used according to the PrimeSTAR GXL protocol.

2.3 Gel analysis

Electrophoresis for isolating DNA fragments has been done using an agarose gel with different percentages of agarose, depending on the expected size of the PCR fragments. Ethidium Bromide was used to stain the fragments. This agent has fluorescence when it is exposed to UV light (312nm), enabling the display of the DNA molecules in the gel. 1x TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer was used, prepared from a stock solution of 50x TAE, according to [12]. For PM fragments we used a 1% agarose gel, whereas for ZS167 we used a 1.5% agarose gel.

3. Results and Discussion

While working with DNA from the parents of our RIL, we found heterozygosity (Fig.1) for the PM locus in *A. linkianum*⁽¹⁾ (two bands). The size of *A. linkianum*⁽¹⁾ bands were 1500bp and 2000bp, while the weight of the same locus in *A. majus* was 1500bp. Due to this double signal in *A. linkianum*⁽¹⁾, we thought of the risk of being working with a hybrid of *A. majus* and *A. linkianum*, because in the gel we could detect

PCR products of different sizes with the same pair of primers.

So for testing this DNA from *A. linkianum*⁽¹⁾ was from a pure line, not from a hybrid; we used a couple of markers developed by [9] and used by [13] for the low resolution map of this RIL: ZS167 (Fig.2). This way, we found the results were consistent and *A. linkianum*⁽¹⁾ was effectively DNA from *A. linkianum*.

Moreover, we sowed seeds of *A. linkianum* from a secure stock. We extracted DNA from one of these plants (*A. linkianum*⁽²⁾) and probed again with the primers of interest (PM). As a result, two bands appeared with the same size than for *A. linkianum*⁽¹⁾ (Fig.1).

This is a preliminary result that may be explained by an insertion of 500bp in one of the alleles of this locus (PM). This insertion may be caused by a transposon [14]. Following studies will be focused in sequencing the different PCR products obtained by using PM primers. As far as a transposable element is the responsible of the insertion, further related studies could be: to identify the phenotype result of this insertion, to classify the type of transposon (MITE, a long terminal repeat LTR...) and its activeness[15].

4. Conclusions

The combination of molecular sources used for identifying the origin of our samples is a good approach for reaching our objective. Nevertheless, for ensuring our results, sequencing of the amplified fragments needs to be done.

5. Acknowledgements

This work was performed as part of the MCINN-FEDER BFU2010-15843. Victoria Ruiz-Hernández holds the FPU13/03606 scholarship from the *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte*.

6. Bibliography

- [1] Vargas P., Carrió E., Guzmán B., Amat E., and Güemes J. 2009. A geographical pattern of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae) speciation since the Pliocene based on plastid and nuclear DNA polymorphisms. *J. Biogeogr.*, vol. 36, no. 7, pp. 1297–1312.
- [2] Langlade N. B., Feng X., Dransfield T., Copsey L., Hanna A. I., Thébaud C., Bangham A., Hudson A., and Coen E. 2005. Evolution through genetically controlled allometry space. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 29, pp. 10221–6.

[3] Mateu-Andrés I. and De-Paco L. 2006. Genetic Diversity and the Reproductive System in Related Species of *Antirrhinum*. *Ann. Bot.*, vol. 98, no. 5, pp. 1053–1060.

[4] Hudson A., Critchley J., and Erasmus Y. 2008. The Genus *Antirrhinum* (Snapdragon): A Flowering Plant Model for Evolution and Development. *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2008, no. 11, p. pdb.emo100–pdb.emo100.

[5] Bradley D., Carpenter R., Sommer H., Hartley N., and Coen E. 1993. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *antirrhinum*. *Cell*, vol. 72, no. 1, pp. 85–95.

[6] Noda K., Glover B. J., Linstead P., and Martin C. 1994. Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature*, vol. 369, no. 6482, pp. 661–4.

[7] Stubbe H. 1966. Genetics and cytology of *Antirrhinum* L. sect. *Antirrhinum*. 421pp.

[8] Schwarz-Sommer Z., de-Andrade Silva E., Berndtgen R., Lonnig W.E., Muller A., Nindl I., Stuber K., Wunder J., Saedler H., Gubitza T., Borking A., Golz J. F., Ritter E., and Hudson A. 2003. A Linkage Map of an F2 Hybrid Population of *Antirrhinum majus* and *A. molle*. *Genetics*, vol. 163, no. 2, pp. 699–710.

[9] Schwarz-Sommer Z., Gubitza T., Weiss J., Gómez-di-Marco P., Delgado-Benarroch L., Hudson A., and Egea-Cortines M. 2010. A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*. *BMC Plant Biol.*, vol. 10, no. 1, p. 275.

[10] Cartolano M., Castillo R., Efremova N., Kuckenberger M., Zethof J., Gerats T., Schwarz-Sommer Z., and Vandenbussche M. 2007. A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nat. Genet.*, vol. 39, pp. 901–905.

[11] I. I.B. 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, vol. 463, no. 7282, pp. 763–8.

[12] Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[13] Ruiz-Hernández V., Weiss J., and Egea-Cortines M. 2015. Desarrollo de marcadores moleculares para *Antirrhinum linkianum* basados

en el mapa genético de *Antirrhinum majus*. Ed: AJICT-UPCT. In press.

[14] Kuang H., Padmanabhan C., Li F., Kamei A., Bhaskar P. B., Ouyang S., Jiang J., Buell C. R., and Baker B. 2009. Identification of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the Solanaceae: new functional implications for MITEs. *Genome Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 42–56.

[15] Feschotte C., Jiang N., and Wessler S. R. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.*, vol. 3, no. 5, pp. 329–41.

Tables and Figures

Tabla 1. PCR conditions

Primers name	Annealing T _a	Elongation time (min)	Digestion
PM	60°C	2	-
ZS167	55°C	0.5	Hinf I

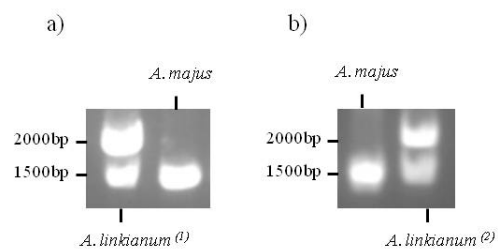


Figure 1. PCR products from PM primers. a) Double band found for *A. linkianum*⁽¹⁾ and simple band in *A. majus*. b) Double band found for *A. linkianum*⁽²⁾ and simple band in *A. majus*

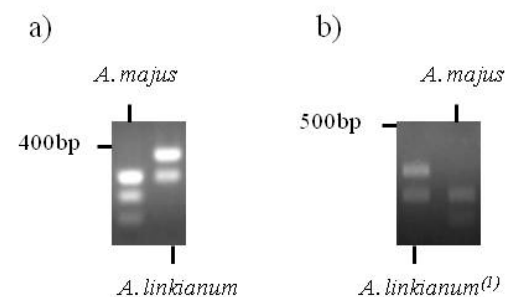


Figure 2. PCR products from ZS167 primers. a) Results found in the low resolution map of [13]. b) Results found using *A. linkianum*⁽¹⁾ DNA

MISTRAL 30®, new platerine obtained from IMIDA-NOVAMED breeding program

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

IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario)
Calle mayor s/n 30150 La Alberca –Murcia- España
antonio.carrillo4@carm.es

RESUMEN

Mistral 30® es una platerina o paraguayo con piel de nectarina, que ha sido obtenida por el programa de mejora que desarrollan conjuntamente IMIDA y NOVAMED. La introducción de esta tipología de melocotón es muy reciente y ha estado marcada por el continuo descarte de las variedades existentes, por presentar diferentes problemas fisiológicos y de adaptación, que deterioraban la productividad y calidad haciendo inviable su comercialización. *Mistral 30®* ha presentado hasta el momento unas características muy interesantes para el productor, ya que no presenta los problemas que venían depreciando la calidad, y esto la puede convertir en una de las primeras platerinas que permanezca en el mercado.

Palabras clave: *Prunus persica*, productividad, calidad, sabor, consumo.

ABSTRACT

Mistral 30® is a flat nectarine, which has been obtained by the breeding program, developed jointly IMIDA and NOVAMED. The introduction of this type of peach is very recent and has been marked by the continuous rejecting of existing varieties, due to having different physiological and adaptive problems that impaired the productivity and quality, disabling marketability. Mistral 30® has presented so far very interesting features to the producer, since no problems coming depreciating quality, and this can become Mistral 30® in one of the first flat nectarine to remain on the market.

Keywords: *Prunus persica*, productivity, quality, taste, consumption

1. Introducción

Las exportaciones de melocotones y nectarinas (incluidas las formas planas) de España han crecido durante los últimos 20 años, llegando en 2014 a las 911.000 t (fuente ICEX). El crecimiento más importante se ha dado en las nectarinas y los paraguayos. La selección de variedades con baja o muy baja acidez y sabores aromáticos son importantes criterios en la selección de nuevas variedades en programas de mejora [1]. Aunque los parámetros de calidad en frutos planos no están afectados por la tipología de fruto melocotón vs. nectarina [2] la aparición de las platerinas aporta una buena combinación de cualidades para el consumo: la facilidad para morder, no es necesario pelar, y unas buenas características organolépticas. El mercado valora las platerinas de forma bien diferenciada y su conocimiento por parte de los consumidores es cada vez mayor.

Por otro lado, la aparición de nuevas variedades tuvo un momento en que todas las platerinas se plantaban por la novedad de la tipología, pero en la actualidad, tanto en Murcia como en el resto de zonas productoras se han ido eliminando por la falta de productividad, calibres pequeños, falta

de coloración, excesivo cracking, apertura pistilar, y en muchos casos varios de estos problemas a la vez (fig. 1).

La clara necesidad del sector de tener variedades de platerinas que no tengan esos problemas, fue lo que llevó a buscar estas variedades dentro del programa de mejora que está desarrollando el IMIDA con algunos de los principales productores de la Región de Murcia (NOVAMED SL).

2. Origen

El cruzamiento que originó la variedad se realizó en 2008, obteniendo los primeros frutos en campo sobre el árbol original en 2010 en La Hoya del Campo (Abarán). Ese mismo año se injertaron algunos árboles sobre patrón Garnem® (GxN-15), sobre los que se han evaluado las características principales en años sucesivos. En 2013 se realizan las primeras plantaciones comerciales en diversos lugares de Murcia, sobre las que también se tomaron algunos datos en 2014.

3. Descripción de la variedad

Mistral 30® es una variedad que hasta el momento, tanto en las fincas del programa de

mejora, como en las parcelas de experimentación dirigidas por productores ha manifestado una adaptación a la zona que le permite superar los problemas que presentan el resto de variedades de platerina y que las descartan para la comercialización.

La variedad florece en la primera década de marzo, lo cual viene determinado por las necesidades de frío calculadas siguiendo el método descrito por Tabuenca (1964) [3], con unos resultados que dejan una horquilla de 405-478 HF < 7 °C que se correspondieron con 644-741 Unidades Chill de Richardson [4] según el modelo de la Universidad de Utah. La fecha de floración (Tabla 2) le permite aparecer como una alternativa para sustituir variedades de floración muy temprana en zonas de riesgo de helada moderado, donde además cubre bien las necesidades de frío. No es recomendable introducirla en la zona citrícola donde probablemente manifestará algunos problemas adicionales originados por la falta de frío invernal.

El fruto (fig.2 y 3) es un paraguayo de carne amarilla, con piel de nectarina, con coloración roja casi plena en toda la superficie antes de maduración, por lo que para determinar la fecha de recolección hay que conocer los datos óptimos de penetrometría (5,25 kg/cm²), ° Brix (14,40) y acidez (3,91 gr/l de ácido málico) (Tabla 1).

4. Diferencias con otras variedades

La variedad referencia en platerinas es Mesembrine®, obtención del INRA, editada por CEP Innovation Sarl, y ha sido la más difundida a nivel comercial [5] pero también con tendencia a desaparecer como el resto de variedades en este caso por la falta de calibre, la irregularidad de calidad de fruta, tanto interanual como dentro de la plantación y problemas de apertura pistilar.

Respecto a esta variedad de referencia, podemos observar los datos obtenidos para ambas en la Hoya del Campo (Abarán-Murcia) en la Tabla 3. Las fechas de floración son idénticas y habilitan a Mistral 30® para ocupar espacios relativamente fríos de la zona frutícola sustituyendo a variedades de floración más temprana mal situadas. La recolección de Mistral 30® es una semana antes que Mesembrine®, no hay otras variedades competitivas en el mercado en ese momento. El contenido de azúcar es superior en Mistral 30®, la acidez es baja y similar en las dos. Mesembrine® tiene mayor firmeza, pero la de Mistral es más que suficiente para una comercialización adecuada. En el tamaño tanto

peso como diámetro y calibres es donde las diferencias de Mistral 30® son muy importantes y la convierten en una variedad muy interesante.

Como muestra se puede observar la Tabla 4 que contiene el escandalo de calidades de una parcela de Mistral 30® de unos 1.000 árboles, a marco de 5x2,5m, que en segundo verde han producido 14 toneladas (fig 4) con la distribución de calibres que arroja un 74 % de la producción de calibre A y superior, y unas cantidades de estrío y segunda que dejan ver con claridad que no se presentan problemas importantes de calidad como en otras variedades

5. Conclusiones

La variedad Mistral 30® cuenta con unas características diferentes a otras existentes, y puede ser una de las primeras variedades que puede permanecer a nivel comercial por sus características que le permiten solucionar gran parte de los problemas de falta de calidad que existían hasta el momento en el resto de variedades. Esta estabilidad que puede aportar Mistral 30® puede ser el punto de inicio del crecimiento de esta tipología de fruta en el mercado.

6. Agradecimientos

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

7. Referencias bibliográficas

- [1] Nicotra, A.; Comte, L., 2003. Nuove tipologie di frutto peri il mercato delle pesche: naascono la serie "ufo". *Frutticoltura*, 7-8, 20-25.
- [2] Reig, G., Iglesias, I., and Echevarria G. 2009. Agronomical performance, fruit quality and sensory attributes of several flat peaches and flat nectarine cultivars. *Acta Horticulturae* 962, VII International Peach Symposium, 563-570.
- [3] Tabuenca, M.C., 1964. Necesidades de frío invernal de variedades de albaricoquero, melocotonero y peral. *Aula Dei* 7, 113-132.
- [4] Richardson, E.A., Seeley, S.D., Walker, D.R., 1974. A model for estimating the completion of rest for "Redhaven" and "Elberta" peach trees. *HortScience*. 1, 331-332.
- [5] Iglesias, I., Carbó, J., 2010 *Melocotón Plano y Nectarina plana*. IRTA ISBN 978-84-931712-1-6.

Tabla 1. Datos de calidad en la finca de IMIDA-Novamed en la Hoya del Campo (Abarán-Murcia)

Tabla 2. Fechas de floración en la Hoya del Campo (Abarán-Murcia) para Mistral 30®

	Inicio floración	Plena floración	Final floración
2012	13-mar	17-mar	21-mar
2013	22-feb	1-mar	8-mar
2014	21-feb	26-feb	2-mar
2015	3-mar	8-mar	11-mar
MEDIA	28-feb	6-mar	10-mar

Tabla 3. Comparativa de datos de Mistral 30® con Mesembrine®

Parámetro	Mesembrine®	Mistral 30®
Floración Inicio	28-feb	28-feb
Inicio recolección	24-jun	15-jun
Coloración %	75	99,2
º Brix	12,1	14,4
Acidez g/l ac.mál.	3,77	3,91
Firmeza Kg/cm ²	7,14	5,25
Peso (g)	86,65	133,47
Diametro mm.	62,12	72,92
Calibre	B35	AA26

Tabla 4. Producciones y escandallo de parcela comercial de 17 meses desde plantación en 1.000 árboles (marco 5x2,5m).

Calibre/calidad	Kg.	Porcentaje
Estrío	271	2%
Segunda	625	4%
D	121	1%
C	309	2%
B	2.502	17%
A	7.147	49%
AA	1.745	12%
AAA	1.735	12%
	14.455	100%

Figura 1. Frutos de la variedad Platinet-1 mostrando los defectos de las platerinas.



Año	% rojo	Firmeza (kg/cm ²)	Peso (g)	ºbrix	Acidez (g/l ac.Malico)
2012	97,60	5,78	136,76	13,15	3,80
2013	100,00	5,50	126,70	15,40	3,46
2014	100,00	4,48	136,94	14,65	4,48
media	99,20	5,25	133,47	14,40	3,91

Figura 2. Ejemplo de presentación de Mistral 30®



Figura 3. Detalle de Frutos de Mistral 30®



Figura 4. Imagen de productividad de Mistral 30® en plantación comercial 17 meses edad.



Expression patterns of antioxidant systems in pioneer plants present in mine tailings contaminated with high concentrations of heavy metals

A. López-Orenes⁽¹⁾, H. Oliveira⁽²⁾, C. Santos⁽²⁾, M.A. Ferrer⁽¹⁾, A.A. Calderón⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena (España). antonio.orenes@upct.es

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

Resumen

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

Palabras clave: *Zygophyllum fabago*; citometría de flujo; división celular; tolerancia al estrés; plomo

Abstract

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

Keywords: *Zygophyllum fabago*; flow cytometry; cell division; stress tolerance; lead

1. Introducción

La contaminación por metales del suelo es un problema en todo el mundo debido a los impactos ecológicos, ambientales y sobre la salud humana, además de que el aumento de los metales pesados en el medio junto con su elevada persistencia, favorecen su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica.

En concreto, el Pb es conocido por afectar negativamente a algunos criterios de valoración del desarrollo de las plantas como la tasa de germinación, el crecimiento y la masa seca de raíces y brotes. La mayor parte del Pb absorbido se encuentra en las raíces con sólo una pequeña fracción que es trasladada a los brotes.

Zygophyllum fabago L. es un arbusto perenne de la familia Zygophyllaceae. *Z. fabago* surge como

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

pueden evolucionar en respuesta a las condiciones ambientales.

En este trabajo se busca evaluar cómo influye el plomo en el ciclo celular en raíces y hojas de tres poblaciones diferentes de *Z. fabago*, y comprobar si estas poblaciones han sufrido una evolución adaptativa para poder implantarse con mayor éxito en las zonas contaminadas. Con esta evaluación se podrán obtener datos sobre la genotoxicidad producida en las plantas de *Z. fabago* al exponerlas a concentraciones conocidas de plomo bajo condiciones controladas. La citometría de flujo (FCM) es una técnica de alta velocidad de análisis que proporciona información sobre las variaciones en el contenido de ADN y poliploidización, variaciones en la dinámica del ciclo celular y, también, sobre el daño del ADN.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material Vegetal

Se obtuvieron semillas de *Z. fabago* procedentes de tres poblaciones, dos procedentes de sendas balsas de estériles mineros, denominadas "Agustín" y "Mercader", y otra población de una zona cercana degradada, todas ellas pertenecientes al Distrito Minero de Cartagena-La Unión (SE España). Las plantas se germinaron y cultivaron en semillero con perlita y se regaron con Hoagland (1/4) suplementado con 2 concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0 y 20 μM) durante 4 semanas. Las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de 16/8 h con 25/20 °C temperatura de día / noche, con una densidad de flujo de fotones de 470 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR.

Después de 4 semanas de tratamiento, las raíces se lavaron durante 10 min en 0,5 mM CaSO_4 , se lavaron abundantemente a continuación con agua destilada, se secaron con papel de filtro y, a continuación, se dividieron las muestras en raíces y hojas.

2.2 Análisis por citometría de flujo

Los cambios en la progresión del ciclo celular se evaluaron en raíces y hojas por FCM, según [4]. Las suspensiones de núcleos se obtuvieron mediante un picado fino en tampón WPB [5] y después se filtró a través de un filtro de nylon de 55 micras. A las suspensiones de núcleos se añadieron 50 mg / ml de yoduro de propidio y 50 mg/ml de RNasa. Los análisis se llevaron a cabo en un citómetro de flujo (EPICS XL-Coulter Electrónica, EE.UU.) equipado con un láser de argón (15 mW, 488 nm).

Se analizaron las poblaciones de núcleos en las fases G0 / G1, S y G2 y los cambios en la progresión del ciclo celular para evaluar el efecto mitogénico / citostático del Pb. Los cambios en la dinámica del ciclo celular también fueron expresados por el PRI (índice de proliferación), que da el porcentaje de células que, en cada población, fueron capaces de superar el punto de control R (entre las fases G0 / G1 y S). La ecuación para obtener el PRI es: $\text{PRI} = (\% \text{ S} + \% \text{ G2}) / (\% \text{ G0} / \text{G1} + \% \text{ S} + \% \text{ G2})$.

2.3. Análisis estadísticos

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

3. Resultados y Discusión

El ciclo celular es el conjunto de eventos que conducen a la división de una célula, es decir, la proliferación celular propiamente dicha. El ciclo celular se encuentra dividido en cuatro fases delimitadas que transcurren siguiendo la secuencia siguiente: G1, S, G2 y M. Las fases G1 y G2 implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Por su parte, la fase S consiste en la replicación del ADN y la fase M en la división celular [6] (Figura 1). La duración completa de este ciclo varía con el tipo de célula y con las condiciones del medio en el que se encuentre. Cuando la célula no está en actividad proliferante se dice que ha salido del ciclo celular y se encuentra en estado de quiescencia, o G0.

Existen varias hipótesis para explicar cómo el plomo es capaz de bloquear el ciclo celular, una de ellas es debido a la interferencia con los mecanismos de reparación del ADN, ya que el plomo tiene la capacidad de sustituir al calcio y/o al zinc de las enzimas implicadas en el procesamiento y reparación del ADN, conduciendo a una inhibición de la reparación del ADN. Su efecto está probablemente relacionado con el aumento de la expresión de genes supresores de tumores. En condiciones normales estos genes presentan niveles bajos en todas las células. Cuando una célula sufre daños en su ADN, o es sometida a estrés, activa la transcripción de determinados genes que conducen a la parada del ciclo celular en G1/S, la reparación del ADN y/o la entrada en apoptosis. Además, también se inhiben las transiciones de G1/S y de G2/M del ciclo celular.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que está regulada genéticamente. Dado que la apoptosis actúa de manera opuesta a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. La apoptosis puede iniciarse al final de la fase G1 para impedir que una célula dañada entre en la fase S, de manera que las mutaciones no se hereden durante la replicación del ADN o en la fase G2 para impedir que las células no alcancen la madurez y entren en mitosis.

Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 1, donde se puede observar que las células en G0/G1 aumentan en presencia de Pb lo que sugiere que se induce un retraso en el ciclo celular al igual que ocurre con la exposición a Cd en lechuga [7], como estrategia para hacer frente a las células que presentan daño en su ADN. Sin embargo, algunas células pueden continuar la proliferación sin, probablemente, completar la reparación del ADN, lo que podría conducir a un proceso de acumulación de mutaciones del ADN en la fase S, aumentando la susceptibilidad a la rotura del ADN. Como resultado del daño del ADN y el avance incontrolado a través del punto de control G2, se pueden perder fragmentos de ADN durante la anafase, por lo que las células hijas podrían mostrar anomalías citogenéticas, como micronúcleos. El efecto del Pb sobre los microtúbulos podría dar un bloqueo en G2 (como puede observarse en la Tabla 1), que luego, durante la mitosis, provocaría que el huso mitótico pueda convertirse en disfuncional, lo que en consecuencia conduciría a anomalías cromosómicas, aberraciones cromosómicas y/o catástrofe mitótica.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que los niveles de plomo afectan significativamente a la división celular en las plántulas de *Z. fabago*, disminuyendo la proliferación celular, provocando un retraso en el ciclo celular y un mayor daño del ADN. Además se puede observar que dependiendo de la población de partida los resultados son diferentes, siendo la población denominada Control más susceptible al plomo que las de Agustín y Mercader, y a su vez, Agustín más que Mercader, lo que conduce a verificar la hipótesis de partida de la diferenciación poblacional en la especie dependiendo de las condiciones presentes en el entorno. Esto podría deberse a una mejora genética desarrollada por la planta para hacer frente a las condiciones ambientales presentes en las balsas de estériles mineros.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] Tordoff GM, AJM Baker, AJ Willis, (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41: 219–228.
- [2] Conesa HM, Faz A, Arnaldos R, (2006). Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailing of the semiarid Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Sci. Total Environ.* 366: 1-11.
- [3] Párraga-Aguado I, Álvarez-Rogel J, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (2013a). Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. *Ecol. Eng.* 58:84–90.
- [4] Rodríguez E, Azevedo R, Fernandes P, Santos C (2011). Cr(VI) Induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. *Chemical Res Toxicol* 24:1040–1047.
- [5] Loureiro J, Rodríguez E, Doležel J, and Santos C, (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Ann Bot.* 100: 875-88.
- [6] Graña X and Reddy EP (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11: 211-219.
- [7] Monteiro C, Santos C, Pinho S, Dias C (2012). Cadmium-induced cyto and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chem Res Tox* 25: 1423–1434.

Tablas y Figuras

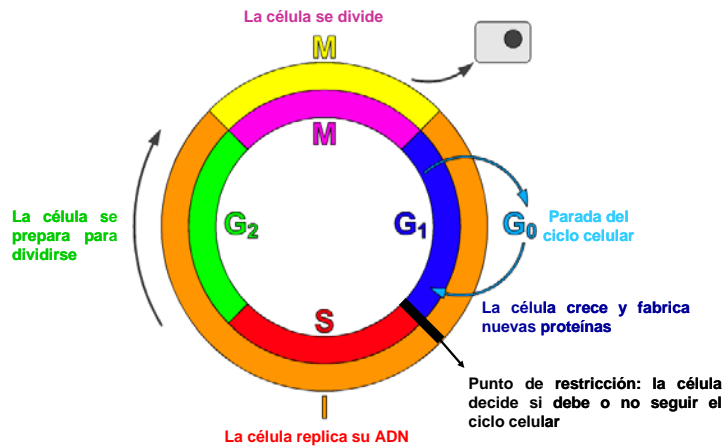


Figura 1. Esquema representativo del ciclo celular (adaptado [6]).

Tabla 1. Características observadas en el ciclo celular. Los resultados están expresados como la media de las determinaciones (n=6), los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

	Pb (µM)	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂	PRI
Control	Hojas				
	0	81.26	8.89	9.85	0.19
	20	87.31*	6.58*	6.11*	0.13*
	Raíces				
	0	82.54	5.05	12.41	0.17
	20	87.70*	3.99*	8.30*	0.12*
Agustín	Hojas				
	0	84.95	6.00	9.05	0.15
	20	85.90	6.05	8.05	0.14
	Raíces				
	0	87.69	3.71	8.61	0.12
	20	94.80*	1.84*	3.35*	0.05*
Mercader	Hojas				
	0	87.35	5.52	7.13	0.13
	20	86.25	6.49	7.26	0.14
	Raíces				
	0	78.34	5.53	16.13	0.22
	20	81.87*	5.14	12.99*	0.18*

Genetic analysis of traits of interest in wine grapes.

A. Bayo-Canha⁽¹⁾, J.I. Fernández-Fernández⁽²⁾, A. Martínez-Cutillas⁽²⁾, L. Ruiz-García⁽¹⁾

(1) Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos, IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario), c/Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, Spain
e-mail: almu.bayo@gmail.com

(2) Departamento de Viticultura y Enología, IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario), c/Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, Spain

RESUMEN

La competencia actual en los mercados vinícolas hace necesaria la búsqueda de nuevas variedades bien adaptadas y con propiedades exclusivas para la creación de vinos de calidad. Desde el IMIDA se lleva a cabo un programa de mejora de uva de vinificación que pretende dotar de nuevas variedades a los agricultores de la región. La optimización de los programas de mejora pasa por el desarrollo de marcadores moleculares que permitan una temprana selección de los genotipos. El presente trabajo expone el estudio a nivel fenotípico y genotípico de una población híbrida con el objetivo final de encontrar nuevas variedades y posibles marcadores que ayuden en los programas de mejora.

Palabras clave: fenotipado, genotipado, población híbrida, QTLs

ABSTRACT

Currently, the competitive in the wine markets makes necessary seek new varieties well adapted and with exclusive proprieties for high quality wines. The IMIDA's wine grape breeding program has the aim to obtain new varieties for our region's growers. The optimization of breeding programs needs the molecular markers development that allows an early genotypic selection. The present work shows the study of a hybrid progeny at phenotypic and genetic level with the final goal to obtain new varieties and molecular markers that help in breeding programs.

Keywords: phenotyping, genotyping, hybrid population, QTLs

1. Introducción

Las exigencias del mercado y las demandas de la industria vinícola crean la necesidad de obtener nuevas variedades de uva de vinificación mejor adaptadas y más competitivas. Por un lado, los problemas que vendrán derivados del cambio climático [1] hacen necesaria la adaptación de las variedades a las nuevas condiciones; por otro, la dura competición en los mercados vinícolas actuales hacen que los viticultores de la Región de Murcia necesiten contar con las herramientas adecuadas para ser competitivos. Para ello, se han diseñado diversos cruces de uva de vinificación desde el IMIDA. La variedad madre usada ha sido Monastrell, debido a su buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la región, siendo el sureste español la zona de mayor producción de esta variedad. Las herramientas biotecnológicas se hacen cada día más patentes en los programas clásicos de mejora, ya que, ayudan a agilizar la selección de los caracteres de interés. El análisis de poblaciones híbridas tanto a nivel fenotípico como genotípico, permite correlacionar el fenotipo observado con un determinado genotipo, e identificar así marcadores basados

en el ADN que sean útiles para la selección temprana de dichos caracteres. En el caso de la uva de vinificación diversos caracteres son importantes, a nivel fenológico una brotación más o menos temprana conlleva una buena o mala adaptación de la planta a las condiciones climáticas. Lo mismo sucede con el momento de la vendimia, la fecha puede ser crucial para evitar un exceso de calor durante la maduración que de lugar a vinos con alto contenido alcohólico, planos y con pocos aromas y color. Además, los caracteres particulares de cada variedad confieren a los vinos unas propiedades únicas que los diferencian en el mercado, por ello, su composición química adquiere un gran interés a la hora de su futura selección como variedades comerciales. Por todas estas razones se ha desarrollado el estudio de esta población híbrida en las condiciones de la D.O. Bullas para, por un lado, encontrar nuevas variedades y, por otro, localizar marcadores moleculares que optimicen los programas de mejora en esta especie.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal y fenotipado

Para la realización de este trabajo se usó una población híbrida proveniente del cruce dirigido entre las variedades de uva comerciales Monastrell y Syrah. Dicha población consta de 230 individuos plantados en un marco de preselección sobre sus propias raíces en la finca experimental Hacienda Nueva (Cehegín), situada en el noroeste de la Región de Murcia. Durante tres campañas consecutivas (2008-2010) se tomaron diversos datos fenológicos: brotación, floración, envero y maduración. Del mismo modo se tomaron datos de producción (peso del racimo, peso de la baya, índice de fertilidad) y morfológicos (forma y compacidad del racimo, forma de la baya y número de semillas por baya). Otros parámetros fueron analizados en la Bodega experimental situada en Jumilla: acidez total, ácido málico, ácido tartárico, pH, potasio, antocianos totales, antocianos extraíbles, polifenoles. Los datos de acidez (total, málico y tartárico) así como los datos de antocianos se analizaron también durante los años 2011-2013.

2.2 Mapa de ligamiento

La construcción del mapa de ligamiento se llevo a cabo con dos tipos de marcadores moleculares; SSR (microsatélites) y SNPs (polimorfismo de una sola base). Para ello se extrajo el ADN (con kit comercial) de la población híbrida y de los parentales. Se usaron los marcadores microsatélites más polimórficos para la población a la vez que se intentó que estuvieran equitativamente distribuidos por los 19 grupos de ligamiento o cromosomas que componen el genoma de la vid. Los SNPs se analizaron en una plataforma externa (CEGEN) con la tecnología SNPlex, utilizando un chip obtenido en el laboratorio de Martínez-Zapater [2]. Se construyeron tres mapas de ligamiento, uno para cada parental y otro consenso, con todos los marcadores útiles analizados y el software JoinMap 3.0.

2.3 Análisis QTL

Los análisis para encontrar zonas cromosómicas ligadas a los caracteres estudiados se realizaron para cada mapa por separado y para cada año y carácter estudiado individualmente. Se llevaron a cabo tres tipos de análisis, uno no paramétrico de Kruskal-Wallis, un Intervalo Simple de Mapeo (SIM) y un Intervalo Múltiple de Mapeo (MQM). Con el análisis SIM obtenemos la LOD, parámetro que nos indica la probabilidad de que un marcador este significativamente ligado a un carácter. En nuestro estudio se establece un valor umbral de LOD al 95% de confianza, tanto a nivel de grupo de ligamiento como a nivel genómico,

obtenido mediante un test de mil permutaciones. Los QTLs que han superado la LOD umbral a nivel genómico en todos los grupos de ligamiento, se analizan en conjunto mediante el método MQM, utilizando los marcadores próximos como cofactores. El mismo análisis se hace para los que han superado la LOD umbral solo a nivel de grupo de ligamiento. Cuando obtenemos un mismo QTL a nivel genómico durante varios años se dice que el QTL es significativo y consistente; si el QTL aparece diversos años solo a nivel de grupo de ligamiento se define como un QTL sugerente. Los análisis se realizaron con el software MapQTL 4.0.

3. Resultados y Discusión

3.1 Fenotipado

Los resultados obtenidos del fenotipado de la población muestran una segregación para todos los caracteres estudiados. Se encontraron segregaciones transgresivas con individuos que superaban la media de los progenitores (Figura 1.). Para la fecha de maduración un 15% de los híbridos maduraron en una fecha posterior al parental mas tardío que fue Monastrell. Para la fertilidad la mayoría de los híbridos mostraron una menor producción que los padres, aunque hubo un 5% de híbridos con la misma producción que Monastrell que fue el parental mas productivo. En el caso de la acidez total un 20% de híbridos obtuvo valores por debajo de los parentales y un 40% de la población tuvo valores superiores. Para los antocianos totales un 20% mostró una concentración inferior a los padres y un 12% tuvo concentraciones superiores. Las segregaciones observadas están en la línea de las obtenidas para otras progenies híbridas estudiadas tanto en uva de mesa [3] como en uva de vinificación [4]. La obtención de híbridos con caracteres extremos ayuda a seleccionar estos caracteres en los programas de mejora, y dichos híbridos pueden ser usados como parentales en futuros programas.

3.2 Mapas

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los marcadores utilizados para la construcción de los mapas de ligamiento. Un total de 177 SSR fueron analizados de los cuales se usaron 104. De los 335 SNPs muestreados fueron polimórficos 137 para esta población. Para el mapa de Monastrell se usaron 166 marcadores de los cuales se posicionaron 160 dando lugar a una longitud total del mapa de 1035cM, con una longitud media de grupo de ligamiento de 54,72cM. En el mapa de Syrah se usaron 196 marcadores de los

cuales 186 se posicionaron dando una longitud de 1039cM, con una longitud media de grupo de ligamiento de 54,54cM. Para el mapa consenso se usaron 251 marcadores de los cuales se posicionaron 238, la longitud del mapa fue de 1175cM, con una longitud media de grupo de ligamiento de 60,14cM. Los resultados obtenidos de los mapas están en concordancia con otros mapas publicados [5,6].

3.2 QTLs

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los QTLs encontrados a nivel genómico para los caracteres destacados en la Figura 1. Para la maduración, el QTL principal se encontró en el grupo de ligamiento 2 próximo al gen que controla el color en vid [7]. Pero también se localizó otro QTL en el mapa de Monastrell en el grupo 17, cuyo análisis en conjunto con el QTL del grupo 2 dio como resultado una explicación de la varianza fenotípica del 20%. El QTL encontrado en el grupo 17 es nuevo para este carácter; respecto a la maduración, otros trabajos ya habían detectado la importancia del QTL en el grupo 2 y otros grupos. Para el índice de fertilidad se encontraron dos QTLs en los grupos 3 y 5; el QTL del grupo 3 solamente se detectó en el mapa de Syrah, mientras que el del grupo 5 se localizó en los tres mapas analizados, con una explicación de la varianza que osciló entre un 14-26%. Estos QTLs vienen a confirmar los resultados de otros trabajos [8,9]. En la acidez de la uva intervienen dos ácidos principales que son el ácido málico y el ácido tartárico. Hemos comprobado, por análisis de correlaciones, que el ácido málico es el que más influye en la acidez total del mosto (datos no mostrados). Para este tipo de compuesto se encontraron diversos QTLs pero destacan dos principalmente, en los grupos 5 y 8, que explican un 20% de la varianza. Estos QTLs se localizaron en dos mapas (consenso y Syrah) y se repitieron varios años, dando consistencia al resultado. En el caso de los antocianos totales analizados, solamente se encontró un QTL que explica un elevado porcentaje de la variación fenotípica (datos no mostrados), coincidiendo con el gen que controla la producción de antocianos en uva [7], siendo fundamental su activación para la producción de los mismos. Estudios posteriores [10] concluyeron que en esa región cromosómica se encuentra una familia de factores de transcripción MYB que controlan hasta el 84% de la producción de antocianos en vid; el estudio se realizó en una colección de germoplasma que incluye diversas procedencias del material vegetal.

4. Conclusiones

El estudio durante varias campañas de esta población híbrida permite la preselección de nuevos genotipos con caracteres especiales y de interés, que pueden ser evaluados como nuevas variedades o ser utilizados como parentales en cruces posteriores, ayudando a fijar en las futuras selecciones caracteres de interés para el viticultor o el enólogo. La construcción del mapa de ligamiento de esta población permite seguir estudiando y comparando los resultados con otras poblaciones analizadas en otros centros de investigación. Los QTLs son una potente herramienta para los programas de mejora vegetal, sobre todo para los frutales cuyas fases juveniles demoran el estudio de sus frutos que es el objetivo final. Encontrar marcadores ligados a caracteres de interés en frutales supone un esfuerzo de años consecutivos de análisis. En el estudio de esta población se han encontrado QTLs prometedores para diversos caracteres pero sobre todo destacamos los encontrados para la acidez, ya que hasta el momento no se han publicado estudios al respecto. Estos resultados pueden ser el primer paso para encontrar marcadores que nos ayuden a seleccionar nuevas variedades en función de su acidez.

5. Agradecimientos

Ana Fuentes por su ayuda en el laboratorio y al equipo técnico de la finca Hacienda Nueva por el mantenimiento y conservación de la progenie en campo.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Jones G.V., White M.A., Cooper OR., Storchmann K .2005 Climate change and global wine quality. *Climatic Changes*. 73:319-343.
- [2] Lijavetzky D., Cabezas J.A., Ibáñez A., Rodríguez V., Martínez-Zapater J.M. 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combing a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC genomics*. 8:424.
- [3] Costantini L., Battilana J., Lamaj F., Fanizza G., Grando M.S. 2008. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): from quantitative traits to underlying genes. *BMC Plant Biology*. 8:38.
- [4] Liu H.F., Wu B.H., Fan P.G., Xu H.Y., Li S.H. 2007 Inheritance of sugars and acids in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) *Euphytica*. 153:99-107.
- [5] Adam-Blondon A., Roux C., Claux D., Butterlin G., Merdinoglu D., This P. 2004. Mapping 245 SSR

markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor Appl Genet.* 109:1017-27.

[6] Doligez A., Bouquet A., Danglot Y., Lahogue F., Riaz S., Meredith P., Edwards J., This P. 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor Appl Genet.* 105:780-795.

[7] Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. 2004. Retrotransposon-Induced mutations in grape skin color. *Science.* 304:982.

[8] Doligez A., Bertrand Y., Dias S., Grolier M., Ballester J., Bouquet A., This P. 2010. QTLs for fertility in table grape (*Vitis vinifera* L.). *Tree Genet Genomes.* 6:413-422.

[9] Grzeslowski L., Costantini L., Lorenzi S., Grando M.S. 2013. Candidate loci for phenology and fruitfulness contributing to the phenotypic variability observed in grapevine. *Theor Appl Genet.* 126:2763-2776.

[10] Fournier-Level A., Le Cunff L., Gomez C., Doligez A., Ageorges A., Roux C., Bertrand Y., Souquet J.M., Cheynier V., This P. 2009. Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. Ssp. *Sativa*) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics Society of America.* 183:1127-1139.

Marker type	Maternal	Paternal	1:2:1	1:3	1:1:1	1:1:1:1	Total
	1:1	1:1					
SSRs	<absaa>	<absab>	<absab>	<aaaaf>	<absac>	<absacd>	
	12	15	4	1*	49	23	104
SNPs	43	69	34	--	--	--	146
CAPS	--	--	1	--	--	--	1
Total	55	84	39	1	49	23	251

Tabla 2. Resumen de los QTLs encontrados a nivel genómico para la maduración el índice de fertilidad y la acidez.

Trait	Map	Year	LG	LOD max	cM	Confidence interval	Cofactor	GW LOD & variance & variance			
								95%	QTL	model	
Ripening	C	2010	2	6.86	51.2	38-60	20D18CB9	5.4	18.1		
	Hn	2009	2	2.91	31.9	24-48	vnc5g7	2.5	9		
		2010	2	5.5	31.9	18-50	vnc5g7	2.7	13.8	20.6	
		17	3.38	0	0-6	SNP677_509	2.7	7.7			
		Hn	2008	5	4.31	0.0	0-7	SNP1027_69	2.7	8.4	
Fertility Index		2009	5	4.14	0.0	0-8	SNP1027_69	2.7	8.1		
		2013	5	7.22	0.0	0-17	SNP1027_69	2.7	14.3		
	Sy	2008	3	4.04	20.1	9-25	ndv_043	2.8	7.4	13.5	
		5	3.79	12.7	0-21	Wvi_5316		7.2			
		2009	5	3.22	8	5-16	Wvi_5316	2.6	6.6		
		2010	5	3.08	12.7	9-15	Wvi_5316	2.7	6.5		
		2013	5	3.38	0.0	0-12	vrzaq47	2.7	6.9		
		Cp	2008	5	9.08	0.0	0-16	SNP1027_69	4.8	21.6	
		2013	5	11.67	0.0	0-32	SNP1027_69	4.4	26.4		
	Malic acid	C	2010	5	4.85	43.9	42-54	vnc16d4	4.3	15.5	25.6
		15	4.56	56.5	48-58	SNP555_132		29.3			
		2013	8	6.22	7.1	0-20	SNP699_311	4.2	19.6		
Hn		2011	4	2.83	52.4	52-55	Wvi_2543	2.7	14.1	22.8	
		9	2.81	70.3	62-75	Wvi_10329		14.9			
		2012	17	3.08	0.0	0-3.5	SNP677_509	2.7	17.3	32.3	
		18	2.92	2.6	2-4	vnc3e5		16.3			
		Sy	2010	5	3.91	41.0	26-44	vnc4c6	2.7	13	24.0
	8	3.52	13.5	6-18	SNP853_312		11.1				
	2013	8	6.21	7.1	0-24	wvip04	2.6	19.5			

Tablas y Figuras

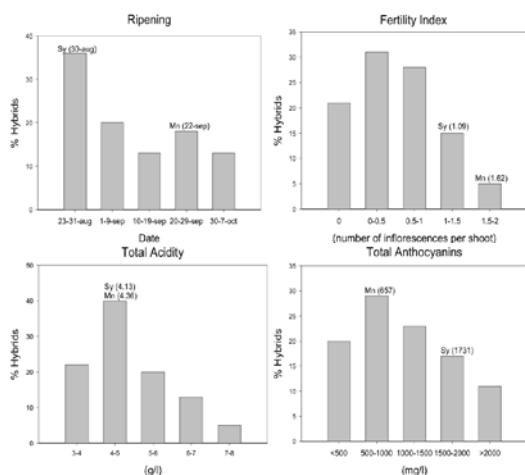


Figura 1. Gráficas de maduración, índice de fertilidad, acidez total y antocianos totales para el año 2010.

Tabla 1. Número y tipo de segregación de los marcadores polimórficos genotipados en la progenie.

Estimates of heritabilities and genetic correlations of carcass quality traits in a reared gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) population sourced from three broodstocks

M. García-Celdrán ⁽¹⁾, G. Ramis ⁽²⁾, E. Armero ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Department of Agricultural Science and Technology. Technical University of Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Spain. martanietos@hotmail.com.

⁽²⁾ Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 3100 Murcia, Spain

Resumen

La calidad de la canal tiene una influencia directa en el producto final y en las preferencias de los consumidores, especialmente en especies como la dorada que son vendidas como pez entero. En este trabajo se estudió el efecto del origen de los reproductores sobre caracteres de calidad de canal. Para ello, una población de dorada cultivada obtenida a partir de lotes de reproductores de diferentes orígenes [mar Cantábrico (CAN), Océano Atlántico (ATL), mar Mediterráneo (MED)] fue analizada para estas características a talla de sacrificio. Además, para estimar heredabilidades y correlaciones genéticas para caracteres de canal así como su correlación con caracteres de crecimiento, realizamos una reconstrucción genealógica. El origen tuvo un efecto en varios caracteres. Los peces del ATL presentaron el menor porcentaje de grasa visceral; los del CAN el menor factor de condición. Todas las variables de canal presentaron heredabilidad media (0.17-0.24) excepto rendimiento canal (0.07±0.05) y filete (0.11±0.05). Dada su correlación genética, seleccionar por peso aumentaría el factor de condición (0.47±0.21) pero también la indeseable grasa visceral (0.42±0.20) disminuyendo el rendimiento filete (-0.58±0.09). Seleccionar por longitud mejoraría el peso canal (0.87±0.07) y filete (0.84±0.09). Alternativamente, el contenido de grasa visceral disminuiría seleccionando por factor de condición (-0.46±0.16).

Palabras clave: Origen de los reproductores; grasa visceral; factor de condición; dorada.

Abstract

Carcass quality traits have a direct influence on final product and consumer preferences, especially in species as seabream that are sold as whole fish. In this study the effect of the origin of the broodstock on carcass quality traits was studied. For this purpose, a population of farmed gilthead seabream obtained from broodstocks from three origins [Cantabrian Sea (CAN), the Atlantic Ocean (ATL), Mediterranean Sea (MED)] was analyzed for these traits at harvest size. Moreover, to estimate heritabilities and genetic correlations for carcass quality traits as well as their correlations with growth traits, a reconstruction of pedigree was carried out. The origin had an effect on several carcass traits. Fish from ATL showed the lowest visceral fat percentage and those from CAN the lowest condition factor. All carcass traits showed medium heritabilities (0.17-0.24) except dressing (0.07±0.05) and fillet (0.11±0.05) percentage. Due to their genetic correlations, selection on weight could lead to an increase in condition factor (0.47±0.21) but also to an undesirable increase in visceral fat (0.42±0.20) and a decrease in fillet yield (-0.58±0.09). Selection on length could improve dressing (0.87±0.07) and fillet weight (0.84±0.09). Alternatively, visceral fat content could be decreased by selection through condition factor (-0.46±0.16).

Keywords: Broodstock origin; visceral fat; condition factor; gilthead seabream

1. Introduction

Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important farmed fish in Europe, especially in the Mediterranean area. Carcass quality traits such as visceral fat and fish morphology, which is reflected in the condition factor, have a direct influence on final product and consumer preferences, especially in species as seabream that are sold as whole fish. Nevertheless, strategies that involve the

development of selection schemes for these traits of economic interest in gilthead seabream are limited. The use of different rearing systems and broodstocks to produce commercial fish usually causes great variability of the production i.e. in the growth rates and the overall quality of the end product [1]. Considering all these circumstances, the aims of this research were: A) To study the effect of the origin of the broodstock on carcass quality traits (condition factor, visceral fat content, dressing weight, dressing percentage, fillet weight and fillet percentage) as

well as to estimate the phenotypic correlations between them and with growth traits (harvest weight and length) in a population of gilthead seabream sourced from broodstock from three origins. B) To estimate genetic parameters (heritabilities and genetic correlations) for growth and these carcass quality traits

2. Materials and methods

2.1 Broodstocks and offspring

Initially, samples of seabream were captured from wild populations from three geographically differentiated origins; Cantabrian Sea (CAN), the Atlantic Ocean (ATL), and Mediterranean Sea (MED). From these samples, three broodstocks were established in different Spanish facilities where fingerlings were obtained and reared in the same conditions. At 84 days post-hatching (dph) a random sample of 2,500 individuals, in which all origins were represented, was taken to the on-growing facilities of the Centro de Cultivos Marinos de la Región de Murcia. Fry were individually tagged for individual identification and then randomly distributed in tanks and reared under communal conditions. At 325 dph about 2,000 specimens were moved to a cage in the Mediterranean Sea and reared under intensive conditions. At harvest size (690 dph), the fish were slaughtered and transported to the laboratory for assays.

2.2 Analyzed traits

Body weight and fork length were measured and condition factor was determined ($100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$). Visceral fat deposits were manually removed, weighed and expressed as a percentage of the body weight; then gutted body weight was recorded (dressing weight) and also expressed as a percentage of the body weight (dressing percentage). Fish were manually skinned and filleted and both fillets were weighed together (fillet weight) and also expressed as a percentage of the body weight (fillet percentage).

2.3 PCR reaction and Genotyping

The genetic characterization of breeders and juveniles and the parental assignments between them were conducted according to [2].

2.4 Analysis data

Data were analyzed using SPSS[®] by the General Liner Model:

$$y = \mu + \text{origin} + \beta * \text{body weight} + e$$

in which y is the data recorded for the analyzed variable, μ is the overall mean, origin the effect of the broodstock origin (CAN, ATL and MED), β was regression coefficient between the analyzed variable and the covariate body weight and e is a random residual error. Pearson correlation was carried out to determine phenotypic correlations among the analyzed parameters. Bivariate analyses were carried out using a Restricted Maximum Likelihood (REML) algorithm to obtain (co)variance components through the following animal linear model, resolved with the software VCE, with body weight as a covariate for carcass quality traits:

$$y = X\beta + Zu + e$$

where y is the recorded data on the studied traits, β the fixed broodstock origin effect, u the random animal effect and e the error.

3. Results and Discussion

All studied traits showed significant differences among origins (Table 1) except fillet weight and percentage ($P=0.08$). Fish from ATL showed the lowest visceral fat percentage and those from CAN the lowest condition factor. The covariate fish weight was positive and highly significant ($P \leq 0.01$) for all studied traits.

All carcass traits, except dressing and fillet percentages, showed medium heritabilities (Table 2) that could allow genetic improvements through implementation of selection programs. However, the moderate genetic variance for carcass and fillet yield suggests that response to selection for increasing yields would be slow. This is probably due to a low degree of repeatability of the processes of gutting and filleting without skin leading to variations in these data [3].

Growth is the most economically important objective in the majority of fish genetic selection programs so it is important to study its genetic correlations with carcass traits. Weight was positively correlated with condition factor as in [4]. The genetic correlation between weight and visceral fat was in the upper range of those previously reported in seabream [5] indicating an undesirable increase of fat with selection for growth in our population. The genetic correlation between harvest and dressing weight could not be estimated. However, dressing weight and length were positively correlated in line with previous results [6] showing that dressing weight increase as length increases. Fillet weight was strongly genetically correlated to length suggesting that fillet weight could be controlled

in fish with improved length. Therefore, the inclusion of length in breeding programmes might be recommended. Regarding growth and fillet percentage, negative genetic correlations were obtained in agreement with previous studies [7] but with low consistency for length due to the high standard error. The correlation between condition factor and visceral fat was negative as in [8]. Therefore condition factor could be useful as a non-invasive index for predicting the response of fish fat deposit content in a breeding programme. This parameter could easily be measured on the live breeding candidates which is effective in the case of individual selection. However, because the evaluation of fat is lethal for breeding candidates, this implies that selection through fat should be done on the basis of slaughtering traits of their relatives. This practice would require identification of families, either by separate rearing or by genotyping [3].

4. Conclusions

The acquisition of a stock is an important aspect of broodstock management in seabream since the different origins presented in the studied population had an effect on important carcass traits. Except dressing and fillet percentages, all carcass traits showed medium heritability and could be included in a selection breeding program. Selection on weight could lead to an increase in condition factor but, at the same, to an undesirable increase in visceral fat and a decrease in fillet yield. Dressing and fillet weigh could be improved through direct selection of length. Condition factor is shown as an interesting alternative trait to be included in a breeding programme. Selection for this trait could lead to a decrease in the undesirable visceral fat and to an increase in weight. All these findings should be relevant for the establishment of successful breeding programs in aquaculture of this species.

Table 1: Phenotypic results (least square means \pm standard error) for weight, condition factor and carcass traits for gilthead seabream from three

5. Acknowledgments

This study was supported by the PROGENSA[®] project (Ref: PNMCM/GEN/09). Spanish Ministry of Environment, Rural and Marine, JACUMAR.

6. References

- [1] Ayala M.D., Abdel I., Santaella M., Martínez C., Periago M.J., Gil F. 2010. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during postmortem storage. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 465-475.
- [2] Lee-Montero I., Navarro A., Borrell Y., García-Celdrán M., Martín N., Negrín-Báez D., Blanco G., Armero E., Berbel C., Zamorano M.J., Sánchez J.J., Estévez A., Ramis G., Manchado M., Afonso J.M. 2013. Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Anim. Genet.* 44: 533-546.
- [3] Kocour M., Mauger S., Rodina M., Gela D., Linhart O., Vandeputte M. 2007. Heritability estimates for processing and quality traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using a molecular pedigree. *Aquaculture* 270: 43-50.
- [4] Kause A., Ritola O., Paananen T., 2002. Coupling body weight and its composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211: 65-79.
- [5] Navarro A., Zamorano M.J., Hildebrandt S., Ginés R., Aguilera C., Afonso J.M. 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G X E interactions, in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). *Aquaculture* 295: 183-187.
- [6] Powell J., White I., Guy D., Brotherstone S. 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 274: 225-231.
- [7] Navarro A., Zamorano M.J., Hildebrandt S., Ginés R., Aguilera C., Afonso J. M. 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. *Aquaculture* 289:225-230
- broodstock origins at harvest age (690 days post-hatching) adjusted to a final fish weight of 232.53 grams

Broodstock origin	CAN	ATL	MED	Covariate ²
N	424	245	221	890
Condition Factor (g cm⁻³)	1.56 ^a ± 0.010	1.71 ^b ± 0.015	1.67 ^b ± 0.015	0.001 ^{**} ± 0.000
Visceral fat (%)	6.24 ^a ± 0.052	5.89 ^b ± 0.077	6.26 ^a ± 0.078	0.006 ^{**} ± 0.001
Dressing weight (g)	204.4 ^a ± 0.71	199.2 ^b ± 1.06	205.3 ^a ± 1.08	0.772 ^{**} ± 0.011
Dressing percentage (%)	88.0 ^a ± 0.23	86.5 ^b ± 0.35	88.3 ^a ± 0.35	0.034 ^{**} ± 0.004
Fillet weight (g)	85.5 ± 0.50	83.8 ± 0.75	85.5 ± 0.76	0.380 ^{**} ± 0.008
Fillet percentage (%)	36.8 ± 0.22	36.0 ± 0.32	36.4 ± 0.33	0.009 ^{**} ± 0.003

¹Broodstock origin: CAN = Cantabrian Sea, ATL = The Atlantic Ocean, MED = Mediterranean Sea; ²Regression coefficient for the covariate fish weight, units are the unit of each trait per gram of fish weight, and standard error (***P* < 0.01); ^{abc}Different superscripts within each row indicate significant differences among origins (*P* < 0.05)

Table 2: Genetic correlations ± standard error (above the diagonal), phenotypic correlations ± standard error (below the diagonal) and heritabilities ± standard errors (in bold at the diagonal) of condition factor, carcass and growth traits estimated from 890 gilthead seabream at harvest age (690 days post-hatching)

	Condition Factor	Visceral fat	Dressing weight	Dressing (%)	Fillet weight	Fillet (%)	Weight	Lenght
Condition Factor	0.18±0.07	-0.46±0.16	-0.62±0.16	-0.10±0.84	-0.15±0.23	0.23±0.92	0.47±0.21	0.01±0.18
Visceral fat	0.76 ^{**} ±0.02	0.20±0.06	0.62±0.15	0.50±0.25	0.53±0.17	-0.23±0.95	0.42±0.20	0.33±0.23
Dressing weight	0.47±0.03	0.47±0.03	0.24±0.06	0.82±0.99	0.01±0.99	0.01±0.99	-	0.87±0.07
Dressing (%)	0.94 ^{**} ±0.01	0.79 ^{**} ±0.03	0.62 ^{**} ±0.03	0.07±0.05	0.99±0.98	0.96±0.99	0.01±0.11	0.01±0.12
Fillet weight	-0.02±0.03	0.12±0.03	0.26±0.02	0.15±0.03	0.17±0.05	0.99±0.98	-	0.84±0.09
Fillet (%)	0.92 ^{**} ±0.01	0.75 ^{**} ±0.02	0.54±0.03	0.93 ^{**} ±0.02	0.38±0.03	0.11±0.05	-0.58±0.09	0.59±0.50
Weight	0.99 [*] ±0.01	0.76 ^{**} ±0.02	0.47±0.03	0.94 ^{**} ±0.01	-0.02±0.01	0.92 ^{**} ±0.01	0.25±0.07	0.86±0.05
Lenght	0.82 ^{**} ±0.02	0.60 ^{**} ±0.03	-0.03±0.02	0.77 ^{**} ±0.02	-0.02±0.02	0.75 ^{**} ±0.02	0.82 ^{**} ±0.02	0.22±0.07

^{**} Significant Pearson correlations between carcass quality traits (*P* < 0.01); - Denotes the correlation that we were unable to estimate due to convergence problems.

Sweet cherry behaviour in the climatic conditions of the Region of Murcia.

G. López-Ortega⁽¹⁾, F. García⁽²⁾, C. Frutos⁽¹⁾, A. Bayo-Canha⁽¹⁾, D. Frutos⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). C/Mayor s/n, 30150. La Alberca, Murcia.

⁽²⁾ Dirección Gral. de Industrias Agrarias y Capacitación Agraria. OCA Vega alta, Cieza, Murcia. gregorio.lopez2@carm.es

RESUMEN

En este trabajo se expone la influencia que ejercen los patrones Adara, Mariana 2624, Mayor, MaxMa 14, Santa Lucía 64, Gisela 5, Gisela 6, Pikú 1, Pikú 3 y Pikú 4 sobre la variedad de cerezo “Newstar”, y se han evaluado 69 variedades de cerezo injertadas sobre Mariana 2624 con intermediario de Adara. Ambos ensayos se han realizado en un suelo pesado, calcáreo y con alto contenido en arcilla ubicado en el término municipal de Jumilla. Se han encontrado diferencias significativas entre patrones para parámetros como el vigor, la producción, el tamaño del fruto, el contenido en sólidos solubles y la firmeza. Mariana 2624 con intermediario de Adara es el patrón recomendado para la zona de cultivo. Los patrones Gisela 5, Gisela 6, SL 64, Mayor y Pikú 1 han presentado un mayor porcentaje de mortandad, lo que hace desaconsejable su uso. Por otro lado, se han determinado aquellas 20 variedades que mejor adaptadas están a la zona del ensayo, y que podrían ser más interesantes por su productividad y calidad de fruto. Sin embargo, no se han encontrado variedades extra-tempranas que puedan ser de interés.

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

ABSTRACT

The influence of Adara, Mariana 2624, Mayor, MaxMa 14, Saint Lucie GF 64 (SL 64), Gisela 5, Gisela 6, Pikú 1, Pikú 3 and Pikú 4 rootstocks onto vegetative growth, yield and fruit quality of “Newstar” sweet cherry cultivar was studied. Also, 69 sweet cherry cultivars grafted in Mariana 2624 with Adara, as interstock, was studied. Both trials were performed in Jumilla, on a heavy and calcareous soil. Significant differences in parameters such as vigour, yield, fruit size, soluble solids content (SSC) and fruit firmness were examined among rootstocks. Mariana 2624 with Adara, as interstock, was the rootstock with better agronomic performance. In general, Gisela 5, Gisela 6, SL 64, Mayor and Pikú 1 presented the highest mortality rate, that advice not to use in our conditions. On the other hand, the results of this investigation showed 20 cultivars that are better adapted and could be considered to introduce this crop in this area for their productivity and fruit quality. However, not early cultivars were found in our study.

Key words: *Prunus avium* L, rootstock, cultivars, adaptation.

1. Introducción

El cerezo dulce (*Prunus avium* L.) es un frutal que crece principalmente en las zonas templadas del hemisferio norte. Es originario de Asia Central, y se adapta bien a multitud de climas, lo que a permitido su cultivo entre los 40° de latitud Norte y los 45° de latitud Sur.

En 2011, los principales países productores fueron: Turquía (438.550 t), Estados Unidos (303.363 t), Irán (241.117 t), Italia (112.775 t) y España (101.729 t) [1]. Debido a que su fruto es de los más apreciados por los consumidores [2], su cultivo ha experimentado un incremento en

países como Turquía y Estados Unidos, que han duplicado su producción en los 10 últimos años, mientras que Irán, Italia y España han mantenido una producción estable.

En la Región de Murcia, el cerezo es uno de los cultivos con mayores expectativas de crecimiento, debido a las condiciones climáticas que facilitan la obtención de cereza temprana y extra-temprana con buenos precios de mercado [3], así como alta calidad debido a los suelos calizos. Este cultivo es una alternativa interesante para aquellas zonas con suficiente frío invernal que tradicionalmente han estado

ocupadas por otros frutales de hueso como melocotonero, albaricoquero y ciruelo.

Otras ventajas son debidas a su menor consumo de agua respecto al de otros cultivos frutales, y a su tolerancia al Plum Pox Virus ('Sharka'). Además, es un cultivo adaptable a la economía de pequeñas explotaciones familiares, que se complementa en sus necesidades de mano de obra de recolección con otras especies frutales.

Por otra parte, existe en Murcia un sector agroalimentario capaz de comercializar la producción de cereza en los mercados nacionales e internacionales. En zonas con inviernos suaves, parece posible su cultivo, aunque para dichas zonas se requieren variedades bien adaptadas y con bajos requerimientos de frío invernal, que permitan una producción de calidad y temprana.

El objetivo de este estudio ha consistido en determinar aquellos patrones y variedades comerciales de cerezo que mejor se adaptan a las condiciones edafoclimáticas de la Región de Murcia, para consolidar este cultivo como actividad alternativa a otros frutales de hueso.

2. Materiales y Métodos

En mayo de 2007 se establecieron dos ensayos de patrones de cerezo diferenciados por su vigor, y una colección de variedades de cerezo en la finca "La Maestra" en el término municipal de Jumilla. De 2007 a 2009, se formaron en vaso de brazos múltiples todos los árboles, se dispusieron con un marco de plantación de 5x2 m, con 2 emisores de 4 l/h por árbol y se fertirrigaron según las necesidades del cultivo. En los ensayos de patrones y en la colección se colocó una fila guarda por todo el perímetro. Durante los años 2010 a 2013 se han tomado datos de fecha de floración, fecha de recolección, sección de tronco (cm²), producción (Kg/árbol), calibre (mm), peso del fruto (g), firmeza (g/mm), contenido en sólidos solubles (°Brix) y acidez (meq/l ácido málico).

2.1 Ensayo de patrones.

En invierno de 2006 los portainjertos se injertaron con la variedad autofértil "Newstar".

2.1.1 Ensayo de patrones de vigor medio a alto.

En este ensayo se han evaluado los patrones Mayor (Selección IMIDA de híbrido de melocotonero x almendro), Mariana 2624 (*P. cerasifera* x *P. Munsionana*), Adara (*P. cerasifera*), SL64 (*P. mahaleb*) y Maxma 14 (*P. mahaleb* x *P. avium*). Se realizó una distribución de bloques al azar con 16 repeticiones, estando la parcela elemental constituida por 5

portainjertos con una planta por patrón. Debido a la incompatibilidad de las combinaciones entre los cultivares de cerezo y los patrones Mayor y Mariana 2624, se usó como intermediario Adara para compatibilizar el cerezo con los anteriores patrones.

2.1.2 Ensayo de patrones de vigor medio a bajo.

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

2.2 Colección de variedades.

En Mayo de 2007 se injertaron en campo las 69 variedades de cerezo que componen la colección. Cada variedad se injertó en 3 árboles contiguos de una misma fila de cultivo.

3. Resultados y Discusión

3.1 Ensayo de patrones.

3.1.1 Ensayo de patrones de vigor medio a alto.

La mayor mortandad registrada durante el periodo estudiado fue para los patrones SL64 (69%) y Mayor (44%), seguidos de Maxma 14 (25%), Adara (13%) y Mariana 2624 (6%). Este resultado está acorde con las características del suelo pesado con alto contenido en arcilla donde se ubicó el ensayo. Tanto SL 64 como Mayor presentaron una elevada mortandad debido a que prefieren suelos profundos y sin problemas de asfixia radicular.

En la Tabla 1 se muestra la producción media, producción acumulada y diámetros de tronco de los portainjertos estudiados. Las mayores producciones medias y acumuladas en el periodo estudiado se registraron para los portainjertos Mariana 2624 y Mayor. Este último alcanzó una producción máxima de más de 40 Kg/planta en 2011. Adara, usado como patrón, (Tabla 2), destacó por tamaño de fruto (8,7 g) y firmeza (334 gf/mm), resultados que coinciden con los encontrados por otros autores para la variedad 'Star Hardy Giant'.

3.1.2 Ensayo de patrones de vigor medio a bajo.

La mayor mortandad registrada durante los años estudiados fue para los patrones Gisela 6 y Piku 1 (100%), de los cuales no se muestran resultados debido al reducido número de plantas que quedaron. Se contabilizó un 38 % de marras en

Gisela 5, un 25% en SL64, y un 13 % en Pikú3 y Pikú 4. Maxma 14 no presentó bajas.

En la Tabla 3 se muestra la producción media, producción acumulada y diámetros de tronco de los citados portainjertos. Las mayores producciones medias y acumuladas en el periodo estudiado se registraron sobre Pikú 4 y SL64, alcanzándose producciones máximas de 25,1 Kg/árbol y 24,8 Kg/árbol en 2010, respectivamente. Pikú 3 destacó por los resultados obtenidos en calidad del fruto (Tabla 4). Dicho portainjerto mostró el mayor tamaño de fruto (9,4 g), la mayor concentración de sólidos solubles (19,8 °Brix), la mayor acidez (8,3 meq/l) y la mayor firmeza (347 gf/mm) en el periodo estudiado.

3.2 Colección de variedades.

Para el total de las variedades se anotaron fechas de floración comprendidas entre el 1 de marzo y el 15 de abril, con floraciones bien agrupadas, lo que es un indicativo de que satisfacen sus necesidades de frío invernal en la zona del ensayo. Por otro lado, se registraron fechas de recolección comprendidas entre el 10 de Mayo y el 10 de Junio. Un total de 20 variedades produjeron como mínimo 10 Kg/árbol y año, llegando en algunos casos a producciones máximas de 46,6 Kg/árbol como en el caso de la variedad “Lapins”, en su 7º verde. Además, dicha variedad obtuvo valores muy estables en la producción de todos los años, al igual que las variedades “4-84”, “Celeste”, “Santina” y “Larian”.

El tamaño del fruto está directamente relacionado con la calidad y con el precio final que el consumidor está dispuesto a pagar. Aunque los calibres medios se situaron en 27 mm, se pueden destacar los calibres alcanzados por “Sanson” con 31mm, “13N-7-19” con 30 mm y “Walter C”, “Sonata” y “Big Lory” con 29 mm. Por otro lado, un total de 34 variedades alcanzaron valores superiores a los 18ºBrix, parámetro importante a la hora de aceptación por parte del consumidor que prefiere frutos con altos contenidos en azúcares, con coloraciones oscuras y firmes. 250 gf/mm, es el valor mínimo de firmeza que el mercado en fresco propone como umbral para la aceptación por parte del consumidor. Un total de 41 variedades presentaron valores superiores al citado umbral, destacando las variedades “44w-11-18”, “Arcina Fercer”, “Lory Bloom”, “13S-18-10” y “Hudson”, que alcanzaron los mayores valores. En la Figura 1, se muestran las 20 mejores variedades,

seleccionadas por productividad y calidad de fruto, ordenadas por fecha de recolección.

4. Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que en las condiciones edafoclimáticas de la Región de Murcia, árboles injertados en patrones de bajo vigor como Gisela 5 y Pikú 1 tienen una tendencia excesiva al enanismo. Por el contrario, un mejor comportamiento agronómico tienen aquellos patrones más vigorosos, que proporcionan mayores cosechas y frutos de mejor calidad que los menos vigorosos. La buena adaptación de los árboles injertados sobre Mariana 2624 y Adara hace que sea recomendable su uso para las plantaciones comerciales en nuestras condiciones de cultivo. Por otro lado, se han destacado 20 variedades de cerezo que por su producción y calidad de fruto podrían servir para la introducción de este cultivo en la zona frutícola de Jumilla.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] Faostat 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Department of statistics.
- [2] Lang, G. A. (2000). Precocious, dwarfing, and productive – How will new cherry rootstocks impact the sweet cherry industry?. HortTechnology, 10 (4), 719-725.
- [3] López, G.; Frutos, D. (2008). Análisis del mercado nacional de consumo de cereza en fresco. Agrícola Vergel, 315:146-151.

Tablas y Figuras

Tabla 1: Producción media y acumulada de los portainjertos de vigor medio a alto estudiados durante los años 2010, 2011, 2012 y 2013. Sección de tronco alcanzado en invierno de 2012, medido a 25 cm del suelo. Evaluación realizada a partir de 5 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$, test de Duncan.

Patrones	Producción media (Kg/árbol)	Producción acumulada (Kg/árbol)	Sección tronco (cm ²)
Mariana	22,6 a	90,4 a	187,7 a
Mayor	21,0 a	83,8 a	141,3 ab
Adara	13,5 a	53,9 b	131,3 b
SL 64	7,2 b	28,9 c	73,3 c
Maxma 14	8,2 b	33,0 c	72,2 c

Tabla 2: Peso del fruto en gramos⁽¹⁾, cantidad de sólidos solubles⁽²⁾, acidez⁽²⁾ y Firmeza⁽³⁾. Los resultados obtenidos son valores medios obtenidos durante los años 2010, 2011, 2012 y 2013. Evaluación realizada a partir de 4 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$, test de Duncan.

Patrones	Peso fruto (g)	SS (°Brix)	Acidez (meq/l) ⁽⁴⁾	Firmeza (gf/mm) ⁽⁵⁾
Adara	8,7 a	17,8 ab	7,4 a	334 a
Mariana	8,5 a	17,6 ab	7,5 a	332 ab
Mayor	8,3 a	17,4 b	7,3 a	318 ab
SL 64	7,6 b	18,1 a	7,5 a	308 b
Maxma 14	7,0 c	17,4 b	7,3 a	319 ab

(1) Calculado a partir de 15 frutos/patrón

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

(3) Calculado de la media de 10 frutos/patrón

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

(5) Fuerza requerida para comprimir el fruto 1 mm.

Tabla 3: Producción media y acumulada de los portainjertos de vigor medio a bajo estudiados durante los años 2010, 2011, 2012 y 2013. Sección de tronco alcanzado en invierno de 2012, medido a 25 cm del suelo. Evaluación realizada a partir de 5 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$, test de Duncan.

Patrones	Producción media (Kg/árbol)	Producción acumulada (Kg/árbol)	Sección tronco (cm ²)
Pikú 4	12,9 a	51,6 a	122,0 a
SL 64	12,3 a	49,4 a	126,8 a
Maxma 14	8,6 b	34,3 ab	107,7 a
Pikú 3	8,4 b	33,6 ab	131,2 a
Gisela 5	2,7 c	10,7 b	29,0 b

Tabla 4: Peso del fruto en gramos⁽¹⁾, cantidad de sólidos solubles⁽²⁾, acidez⁽²⁾ y Firmeza⁽³⁾. Los resultados obtenidos son valores medios obtenidos durante los años 2010, 2011, 2012 y 2013. Evaluación realizada a partir de 5 plantas/portainjerto. En cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$, test de Duncan.

Patrones	Peso fruto (g)	SS (°Brix)	Acidez (meq/l) ⁽⁴⁾	Firmeza (g/mm) ⁽⁵⁾
Pikú 3	9,4 a	19,8 a	8,3 a	347 a
Pikú 4	8,4 b	18,4 c	7,7 ab	319 b
SL 64	8,1 b	18,7 bc	7,5 ab	335 ab
Maxma 14	7,6 c	18,2 c	7,4 ab	333 ab
Gisela 5	7,3 c	19,2 b	6,8 b	318 b

(1) Calculado a partir de 15 frutos/patrón

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

(3) Calculado de la media de 10 frutos/patrón

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

(5) Fuerza requerida para comprimir el fruto 1 mm.

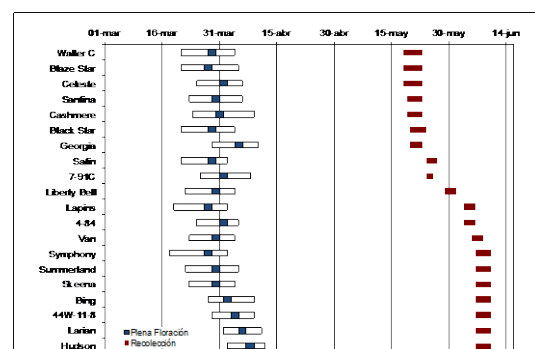


Figura 1: Fechas de floración y recolección de las 20 mejores variedades.

Using 23S rDNA to identify contaminations of *Escherichia coli* in *Agrobacterium tumefaciens* cultures

M. Manchado Rojo^{(1,2,*), J. Weiss}^{(1,2), M. Egea-Cortines}^(1,2)

⁽¹⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII nº 48, 30203 Cartagena (Murcia)

⁽²⁾ Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII nº 48, 30203 Cartagena (Murcia)

*e-mail address: mmr12@alu.upct.es

Abstract

Cross contamination of *Agrobacterium tumefaciens* stocks with *Escherichia coli* are difficult to identify by microbiological techniques, leading to false negative results in transformation experiments. We have developed a genotyping assay for *A. tumefaciens* and *E. coli* lab strains based on amplification of 23S rDNA by PCR. *Agrobacterium* strains LBA 4404, C58 and EHA105 and *E. coli* DB3.1, DH5 α and XL1-Blue can be identified separating the corresponding PCR amplicons in 2.5% agarose gels. However in crossed contaminations, interpretation of results is improved using melting point analysis on a quantitative PCR machine.

Keywords: Bacteria; Genetic transformation; PCR;

1. Introduction

Handling of different microbial strains in laboratory practice can turn into a problem when different bacteria become contaminated with each other. In most cases, contamination of bacterial strains is the result of sharing plasticware, pipettes and solutions. Furthermore, although different bacterial genera can be grown on specific media, simplicity has led to a generalized use of common growth media as long as they do not interfere with bacterial properties. Two types of bacterial genera are routinely used in plant biology laboratories, *Escherichia coli* used for general cloning and *Agrobacterium tumefaciens* to obtain transgenic plants.

Recent advances in cloning strategies based on recombination cloning coupled with virus-induced gene silencing (VIGS) [1] allow research projects where hundreds to thousands of genes can be tested for loss of function. The standard procedure is the construction of cDNA libraries and development of recombinant libraries in vectors suitable for VIGS. These recombinant libraries are then transferred to *Agrobacterium* that is used to obtain transiently transformed plants expressing the cDNA cloned as double stranded RNA that causes post transcriptional gene silencing. This technology has been shown to work in different plants like *Papaver* [2], potato [3] or petunia [4].

But one obvious problem is that if *Agrobacterium* strains are contaminated with *E. coli*, then some of the colonies processed will not transform plants giving as a result a false negative. Although *E. coli* and *Agrobacterium* can be differentiated by microbiological techniques, it is much faster to establish a genotyping protocol based on PCR that will allow the identification of *E. coli* contaminations in those cases where there is doubt of the purity of the *Agrobacterium* strain. In this study we report the development of a genotyping assay to distinguish between *E. coli* and *Agrobacterium*.

2. Materials and Methods

2.1 Strains

The strains used were in the case of *E. coli* DH5 α , and DB3.1 from Invitrogen and XL1-Blue from Stratagene. Whereas that for *Agrobacterium* the strains used were LBA 4404, C58 and EHA105.

2.2 Bacterial culture

We grew on LB medium to complete saturation the *E. coli* strains DH5 α , and DB3.1 and XL1-Blue at 37°C while the *Agrobacterium* strains LBA 4404, C58 and EHA105 were grown at 28°C.

2.3 DNA extraction

Extraction of bacterial genomic DNA was performed starting from 1.5mL of saturated culture. Samples were centrifuged and the

bacterial pellets were resuspended in 1 mL of TE buffer (10 mM Tris HCL, 1mM EDTA, pH 8.0) and lysed with 200 µg of lysozyme and 1% SDS. Protein was digested with 500 µg of proteinase K incubating at 65°C for one hour. Genomic DNA was purified from the samples by standard phenol:chloroform extraction and precipitation [5]. The resulting pellets were resuspended in 100 µL of TE buffer.

2.4 PCR

Amongst the possible genome regions valuable for genotyping, the intergenic transcribed spacer (ITS) has been found useful in plants [6], the 23S rDNA and the 16S-23S rDNA spacer in bacteria [7], or 5.8S-ITS region to identify yeast contamination in food samples [8]. We used specific primers that amplify the bacterial 23S rDNA (23S-forward ACCAGGATTTGGCTTAGAAG and 23S-reverse CACTTACCCCGACAAGGAAT) [7] in a standard PCR experiment performed with Tag polymerase from Promega. The cycling conditions consisted in thirty cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 62°C and 30 seconds at 72°C. Reaction products were separated using 2.5% agarose gels containing ethidium bromide, and visualized with a UV transilluminator.

3. Results and Discussion

Amplification products from *Agrobacterium* and *E. coli* could be visually differentiated on the gel, showing PCR fragments of 780 and 850bp respectively (Fig.1A). This suggests that direct analysis of PCR products is feasible. However we found that in complex mixtures of bacterial strains i.e when there is contamination of *Agrobacterium* with *E. coli*, it would be better to have a more powerful assay since the size differences between amplicons make results difficult to interpret on agarose gels (data not shown). We solved this problem by performing a qPCR on a CR-Corbett Research-quantitative PCR using TaKara Sybr Green quantitative PCR amplification kit. The PCR conditions were an initial denaturation of 5 minutes at 95°C followed by forty cycles with a scheme of 95°C 30 seconds, 62°C 30 seconds, 72°C 30 seconds, a read at 83°C for 15 seconds and finally a melting point analysis starting at 60°C and reaching 94°C with reads every 0.5°C for 15 seconds. The melting point of the 23S rDNA region of *Agrobacterium* and *E. coli* differed by 1.6°C (87.9 and 89.5 respectively),

giving clear-cut results that allow the genotyping of *Agrobacterium* and *E. coli* (Fig 1.B).

4. Conclusions

In summary, we developed a PCR assay to genotype *Agrobacterium* and *E. coli* that helps overcome situations of cross contamination between these types of bacteria. The protocol presented should be useful to test clones that do not appear to transform plants, and this lack of transformation capacity could be the result of contaminated bacterial stocks. Our approach has the additional advantage of being based on codominant PCR markers that should be more useful than *Agrobacterium* or *E. coli* specific PCR makers.

5. Acknowledgements

This work was financed by the Fundación Séneca de la Región de Murcia and BIOCARM.

6. References

- [1] Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., and Dinesh-Kumar, S. P. (2004) *Plant Journal* **39**, 734-746.
- [2] Hileman, L. C., Drea, S., de Martino, G., Litt, A., and Irish, V. F. (2005) *Plant Journal* **44**, 334-341.
- [3] Brigneti, G., Martin-Hernandez, A. M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D. C., Baker, B., and Jones, J. D. (2004) *Plant J* **39**, 264-72.
- [4] Chen, J. C., Jiang, C. Z., Gookin, T. E., Hunter, D. A., Clark, D. G., and Reid, M. S. (2004) *Plant Molecular Biology* **55**, 521-530.
- [5] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- [6] Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., and Janzen, D. H. (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8369-8374.
- [7] Hong, B. X., Jiang, L. F., Hu, Y. S., Fang, D. Y., and Guo, H. Y. (2004) *Journal of Microbiological Methods* **58**, 403-411.
- [8] Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomez, A., and Weiss, J. (2007) *Food Control* **18**, 33-39.

Figure

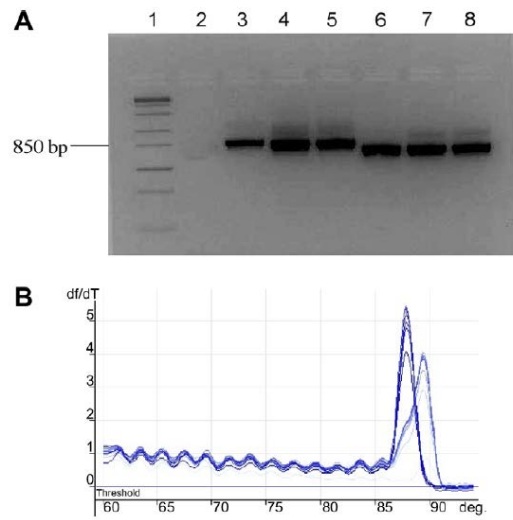


Figure 1. (A) Amplification of 23S rDNA from bacterial samples by PCR. Lane 1 molecular weight. Lane 2 negative control; Lane 3 *E. coli* DB3.1; Lane 4 *E. coli* DH5 α ; Lane 5 XL1-Blue; Lane 6 *A. tumefaciens* LBA4404, Lane 7 C58; Lane 8 EHA105. Molecular weight markers were ZipRuler ladder-1 from Fermentas with molecular weights of 10000, 5000, 3000, 2000, 1200, 850, 500, 300 and 100 bp. **(B)** Melting curve of samples of *A. tumefaciens* and *E. coli*. The peak at 89.5 degrees corresponds to duplicated samples of DB3.1, DH5 α and XL1-Blue, while the peak at 87.9 corresponds to LBA4404, C58 and EHA105 *A. tumefaciens* strains

Differential growth of the main parts of the carcass rabbit

A. Martínez-Bas ⁽¹⁾⁽³⁾, E. Armero ⁽¹⁾, M. Kessler ⁽²⁾

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

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

⁽³⁾ E-mail address: anamartinezbas@hotmail.com

RESUMEN

En el presente proyecto se planteó buscar alternativas en la comercialización de la carne de conejo que le den valor añadido y/o que le abra la puerta a nuevos mercados y mejore la rentabilidad de las explotaciones ganaderas. Para llevar a cabo el estudio, se seleccionaron 2.294 conejos a las 8 semanas de edad (machos y hembras, uno de cada camada) de tres líneas genéticas (Ebro, Grimaud e Hyla), la mitad de cada una de las líneas se alimentó con un pienso distinto (dieta A y dieta B), hasta que alcanzaron las 16 semanas de edad que finalizó el ensayo. Decidimos completar el estudio del crecimiento con el cálculo del crecimiento diferencial, que compara atemporalmente el crecimiento de cada una de las partes del conejo respecto a su peso vivo al sacrificio. La distribución de los gradientes de velocidad de crecimiento diferencial siguió un orden lógico de acuerdo con otros autores. Aunque cabe destacar que encontramos diferencias en el crecimiento relativo de las patas delanteras y la caja torácica. Así, las patas delanteras, en nuestro caso fueron de crecimiento tardío; lo que incrementa el valor comercial, porque aunque crecieron lento en las primeras fases de desarrollo en las últimas semanas crecieron mucho. También siguieron este tipo de crecimiento los depósitos de grasa escapular, inguinal y perirrenal; así como de grasa intramuscular; lo que resulta beneficioso para la producción de productos transformados de alto valor añadido, como sobrasadas, patés, mortadelas, longanizas y hamburguesas.

Palabras clave: conejo, canal, alometría, crecimiento diferencial.

ABSTRACT

In the present project we suggest alternatives in the marketing of rabbit meat that give added value and / or open the door to new markets and improve the profitability of farms. To perform the study, 2294 rabbits were selected at 8 weeks of age (male and female, one from each litter) three genetic lines (Ebro, Hyla, Grimaud), half of each of the lines is fed a feed different (diet A and diet B) until they reached 16 weeks of age who completed the trial. We decided to complete the study of growth with the calculation of differential growth, timelessly compares the growth of each rabbit parties regarding their live weight at slaughter. The distribution of velocity gradients differential growth followed a logical order according to other authors. Although it is noteworthy that we found differences in the relative growth of the front legs and rib cage. Thus, the forelegs, in our case were late growth; which increases the market value, because although they grew slowly in the early stages of development in recent weeks grew much. They also followed this type of growth scapular fat deposits, inguinal and perirenal; and intramuscular fat; which is beneficial for the production of high value-added processed as sobrasadas, pate, mortadella, sausages and burgers products.

Palabras clave: rabbit, carcass, allometry, differential growth.

1. Introducción

España es el tercer productor de carne de conejo, precedido por China e Italia. (FAOSTAT, 2013). Esta carne es el 5º tipo de carne más consumida, tras el cerdo (57%), pollo (24%), la vaca (13%) y la oveja (4%) (MAGRAMA, 2013). En nuestro estudio en capítulos anteriores, observamos que la eficiencia alimentaria disminuye radicalmente a partir de la doceava semana; pero para la elaboración de estos productos de valor añadido

es necesario obtener canales más pesadas de lo habitual. Así, dentro del objetivo general del proyecto hemos incluido un capítulo de estudio atemporal del crecimiento, denominado diferencial o relativo.

El crecimiento diferencial de un elemento es la evolución del porcentaje que supone respecto a su propio peso en un momento de referencia (Huxley, 1932). Es decir, la relación entre las tasas relativas de crecimiento de los componentes

corporales permanece constante, independientemente de las variaciones experimentadas por cada una de ellas.

Nuestra muestra para el estudio del crecimiento diferencial constó de animales entre 7 y 16 semanas de edad, alimentados con dos tipos de piensos con distintos niveles energéticos; y tres líneas genéticas como machos finalizadores: Grimaud, Ebro e HYLÁ. Además se estudió la influencia del género: se engordaron tanto machos como hembras.

2. Materiales y Métodos

2.1 Animales

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

2.2 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con la ecuación de Huxley (1932) en su forma logarítmica:

$$\log y = \log a + b \cdot \log x$$

y = magnitud del componente estudiado.

x = magnitud del componente de referencia (en nuestro caso Peso Vivo al Sacrificio).

a = parámetro de la función.

b = coeficiente alométrico. Relación de las tasas relativas de crecimiento diferencial. Hay 3 tipos:

b = 1 → isometría.

b > 1 → isometría positiva. El componente crece poco en las primeras fases y mucho en las últimas. También llamado *tardío*.

b < 1 → alometría negativa. El componente crece mucho en las primeras fases y poco en las últimas. También llamado *temprano o precoz*.

3. Resultados y Discusión

Según indica el coeficiente de alometría (ver Tabla 2), los componentes con alometría positiva, es decir, con poco crecimiento en las primeras fases y mucho crecimiento en las últimas han sido: piel, grasas (subcutáneas e intramusculares), patas delanteras y traseras, lomo y músculo. Mientras que las partes del conejo que han crecido mucho en las primeras fases y poco en las últimas (alometría negativa) han sido: hígado, riñones, resto, cabeza, caja torácica y hueso.

Respecto a las vísceras, destacamos que el hígado presentó valores de crecimiento temprano de $0,40 \pm 0,05$; valores más bajos que otros autores como Deltoro et al., (1985), cuyos resultados fueron de $0,88 \pm 0,06$, o Pascual, M. (2007) con valores de $0,70 \pm 0,07$. Acorde a otros autores el patrón de crecimiento precoz de los riñones y la caja torácica se ha observado en varias especies además de conejo (Deltoro et al., 1984a). Ya que los conejos, al igual que las aves son animales con tasas de crecimiento altas, y se caracterizan por el desarrollo temprano de los órganos concernientes a crear la energía disponible para los procesos del crecimiento, especialmente el hígado y el tracto alimentario. Nuestros resultados de crecimiento tardío para grasa, y temprano para hueso, coinciden con los resultados de otros autores para conejo: Cantier et al., 1969.

Sin embargo, el músculo ha mostrado diferentes patrones de crecimiento alométrico en otras especies. Aunque en nuestro caso el músculo de la pata derecha trasera es de desarrollo tardío, en el caso del cerdo mostró desarrollo temprano según Evans et al., 1979. Esta diferencia en el patrón de crecimiento en el músculo es debido a la pequeña cantidad de grasa diseccionable en conejo comparada con otras especies (Blasco et al. (1990)).

El efecto de la línea genética (Tabla 3) presenta claras diferencias significativas en el desarrollo alométrico de la piel. Así, Grimaud es de crecimiento más rápido que Ebro en el caso de la piel; y también en el caso de la cabeza, el lomo y el hueso.

No se han encontrado diferencias significativas para el valor de b entre géneros en el crecimiento relativo de las grasas, vísceras (hígado, riñones y conjunto de tráquea, pulmones, esófago, corazón y timo), de las patas delanteras, la caja torácica, el lomo, el músculo, el hueso y la grasa intramuscular.

Y respecto a la alimentación, hay un claro efecto del tipo de dieta en el crecimiento diferencial de la grasa escapular y del hígado.

4. Conclusiones

Si en la práctica se adopta la producción de canales más pesadas, tendríamos partes nobles más desarrolladas, ya que éstas son de crecimiento tardío, es decir, que crecen poco en las primeras fases y mucho en las últimas. Además, en nuestro caso, a diferencia con otros autores, las patas delanteras también son de crecimiento tardío; lo que incrementa el valor comercial. Paralelamente, los depósitos de las grasas escapular, inguinal y perrirenal; así como

de la grasa intramuscular; podrían ser utilizadas para la producción de productos de transformados de alto valor añadido, como sobrasadas, patés, mortadelas, longanizas y hamburguesas.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] http://faostat3.fao.org/browse/FB/*/E
- [2] <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/>
- [3] Huxley, J. S. 1932. Problems of relative growth. Lincoln Mac Veagh—The Dial Press, New York
- [4] Deltoro, J., and Lopez, A. M. 1985. Allometric changes in rabbits. *Journal of Agricultural Science*, 105, 339–346.
- [5] Pascual, M. 2007. Effect of selection for growth rate on carcass composition and meat quality in rabbits. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 43-54.
- [6] Deltoro, J., Lopez, A. M., and Blasco, A. 1984a. Alometrías de los principales componentes corporales, tejidos y medidas de la canal en conejo. I. Proc. 3rd World Rabbit Congress. Roma, Italy. pp. 570–577.
- [7] Cantier, A., Vezinhet, R., Rouvier, R., and Dautier, L. 1969. Allométrie de croissance chez le lapin (*O. Cuniculus*). 1. Principaux organes et tissues. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*, 9, 5–39.
- [8] Evans, D. G., and Kempster, A. J. 1979. The effects of genotype, sex and feeding regimen on pig carcass development. *Journal of Agricultural Science*, 93, 339–347.
- [9] Blasco, A., Gou, P., and Santacreu, M. A. 1990. The effect of selection on changes in body composition of two lines of rabbit. Proc. 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (pp. 362–365), Edinburgh, Scotland.

Tabla 2. Valores medios y errores estándar de los coeficientes (a,b) de la ecuación de Huxley para las diferentes partes de la canal respecto al Peso Vivo al Sacrificio, según la línea genética (EBRO, BRIMAUD, HYL A), el sexo (1:MACHOS, 2:HEMBRAS) y el pienso (A, B).

Variables	Nivel de significación				
	log a (±s.e.)	b (±s.e.)	Línea Genética	Sexo	Pienso
Piel	-3,38(0,34)	1,14(0,04)	***	**	*
Gesc	-8,83(0,90)	1,39(0,11)			***
Ging	-7,95(0,887)	1,31(0,10)			*
Gper	-17,93(0,07)	2,65(0,08)			
Hígado	1,10(0,40)	0,40(0,05)	*		***
Riñones	-0,43(0,24)	0,42(0,03)	*		
Resto	-1,12(0,24)	0,58(0,03)	*		
Cabeza	-1,43(0,22)	0,80(0,03)	*	*	*
Pdelan	-4,35(0,20)	1,26(0,03)			**
Ptrase	-2,22(0,15)	1,07(0,02)		*	
Caja	-1,58(0,32)	0,81(0,04)			
Lomo	-4,38(0,19)	1,31(0,03)	*		
M	-4,62(0,17)	1,23(0,02)	*		*
H	-0,60(0,36)	0,49(0,05)	**		
Gintram	-3,64(0,65)	1,12(0,08)	*		*

Gesc: grasa escapular, **Ging:** grasa inguinal, **Gper:** grasa perirrenal, **Resto:** conjunto de tráquea, esófago, timo, pulmones y corazón, **Pdelan:** patas delanteras, **Ptrase:** patas traseras, **Caja:** caja torácica, **M:** músculo de la pata trasera, **H:** hueso de la pata trasera, **Gintram:** grasa intramuscular

Tabla 3. Valores medios y errores estándar de los coeficientes (a,b) de la ecuación de Huxley para las diferentes partes de la canal respecto al Peso Vivo al Sacrificio, según la línea genética (EBRO, BRIMAUD, HYL A), el sexo (1:MACHOS, 2:HEMBRAS) y el pienso (A, B).

Variables	Dif. GL. EBRO_GRIMAUD		Dif. GL. HYL A_GRIMAUD		Dif. S _{2,1}		Dif. F _{B,A}	
	log a (±s.e.)	b (±s.e.)	log a (±s.e.)	b (±s.e.)	log a (±s.e.)	b (±s.e.)	log a (±s.e.)	b (±s.e.)
Piel	1,81(0,43)	-0,24(0,05)			1,04(0,40)	-0,14(0,05)	0,86(0,40)	-0,11(0,05)
Gesc							-4,25(1,09)	0,54(0,14)
Ging							-2,14(1,07)	0,28(0,13)
Gper								
Hígado	-1,21(0,48)	0,15(0,06)	-1,28(0,51)	0,16(0,06)			-0,90(0,27)	0,12(0,03)
Riñones	-0,49(0,25)	0,07(0,03)						
Resto			0,64(0,26)	-0,09(0,03)				
Cabeza	0,66(0,27)	-0,081(0,03)			0,63(0,25)	-0,08(0,03)	0,58(0,26)	0,07(0,03)
Pdelan							-0,64(0,24)	0,08(0,03)
Ptrase					-0,22(0,10)	0,03(0,02)		
Caja								
Lomo	0,45(0,23)	-0,06(0,03)						
M	-0,44(0,21)	0,05(0,03)					0,26(0,12)	-0,03(0,01)
H	1,36(0,44)	-0,17(0,06)						
Gintram	-1,42(0,69)	0,18(0,08)					-1,93(0,81)	0,24(0,10)

Gesc: grasa escapular, **Ging:** grasa inguinal, **Gper:** grasa perirrenal, **Resto:** conjunto de tráquea, esófago, timo, pulmones y corazón, **Pdelan:** patas delanteras, **Ptrase:** patas traseras, **Caja:** caja torácica, **M:** músculo de la pata trasera, **H:** hueso de la pata trasera, **Gintram:** grasa intramuscular

Trailing plants, identification of T-DNA mutants and introgressions of Antirrhinum linkianum in A. majus

R. Alcantud⁽¹⁾, J. Weiss^(1,2), M. Egea-Cortines^(1,2)

⁽¹⁾Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

⁽²⁾ Genética Molecular. Instituto de Biotecnología Agroalimentaria . Universidad Politécnica de Cartagena. 30202 Cartagena. ESPAÑA. raquelalcantudrodriguez@gmail.com

Resumen

El objetivo planteado es la creación de una población mutagenizada de *Antirrhinum majus* y el seguimiento de una población segregante entre *Antirrhinum majus* y *Antirrhinum linkianum*. Para lograr la población mutagenizada en un primer paso se ha modificado un plásmido mediante técnicas moleculares seguido de su transformación en *Agrobacterium tumefaciens*. Este paso preliminar nos permite generar una población transformada T₀. Las inserciones de T-DNA son aleatorias y van a crear una población T₀ transgénica en heterocigosis. Para la identificación de mutantes recesivos utilizaremos poblaciones T₁ segregantes que permiten identificar plantas transgénicas con un fenotipo de interés en homocigosis. Entre las mutaciones de interés prioritario destacan las involucradas en el ritmo circadiano, la floración y la arquitectura floral. El hecho que la secuencia de T-DNA sea conocida nos va a permitir amplificar la secuencia flanqueante mediante PCR. A continuación secuenciaremos el gen mutagenizado. Para analizar la segregación de un retrocruce entre *Antirrhinum majus* y *Antirrhinum linkianum* se han utilizado plantas procedentes de la línea isogénica 165E de *A. majus* y plantas tapizantes de *Antirrhinum linkianum*. Estas plantas procedían de una población RIL (Recombinant inbred line). Se está estudiando su comportamiento en siguientes poblaciones.

Palabras clave: T-DNA; mutagénesis insercional; ritmo circadiano; retrocruce; segregación;

Abstract

The aim of our work is to create a mutagenized population of *Antirrhinum majus* and to check a segregating population between *Antirrhinum majus* and *Antirrhinum linkianum*. For obtaining the mutagenized population, first we modified a plasmid through molecular techniques, followed by its transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. This preliminary step allows us to generate a transformed population T₀. T-DNA insertions are in a random system and are going to create a T₀ transgenic population in heterozygosity. For identifying recessive mutants we will use T₁ segregating populations, which will allow us identifying transgenic plants with an interesting phenotype in homozygosity. Among the most interesting mutations, we will highlight those involved in circadian rhythm, flowering and flower architecture. The fact that the T-DNA sequence is known, will allow us to amplify the nearby zone by PCR. Then we will sequence the mutagenized gene. For analyzing the segregation of a backcross between *Antirrhinum majus* and *Antirrhinum linkianum*, we have used plants from the isogenic line 165E of *A. majus* and trailing plants from *Antirrhinum linkianum*. These plants came from a RIL (Recombinant Inbred Line). We are studying their behavior in subsequent populations.

Keywords: T-DNA; insertional mutagenesis, circadian rhythm, backcross, segregation

1. Introducción

Hoy en día junto con *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum* es uno de los modelos más utilizados para estudios de clonación de mutantes, y para los presentes trabajos de genética y desarrollo de plantas. En la actualidad los protocolos de

transformación y análisis fenotípicos están desarrollados en su totalidad [1] En el presente trabajo, aplicando estos protocolos, trabajaremos con *Antirrhinum majus* 165E y *Antirrhinum linkianum*. Los dos ensayos propuestos con sus objetivos son 1º Utilizando *Antirrhinum majus* realizaremos una inserción de

T-DNA utilizando *Agrobacterium*. A partir de la población T₀ con el T-DNA insertado, llegar a poblaciones T₁ y T₂ que permitan identificar mutaciones, en volátiles, ritmo circadiano, floración, análisis fenotipo. 2º Utilizando una población RIL (recombinant imbred line) entre *Antirrhinum majus* y *Antirrhinum linkianum* se hará un seguimiento de las siguientes poblaciones. Desde la F₃ realizar un retrocruce con silvestre 165E para observarla segregación en la siguiente generación y conocer el número de genes involucrados en el genotipo tapizante.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales utilizados:

Para el ensayo 1º Se utilizó el plásmido pMDC100, introducido en la bacteria *E. Coli* obteniendo una bacteria transformada con el T-DNA en el plásmido, que se introdujo en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y con esta bacteria se insertó en la planta, *Agrobacterium* inserta su plásmido en la planta y una parte del mismo se integra por recombinación ilegítima en el genoma de la planta. Para el ensayo 2º Se utilizó la F₃ de las plantas de *A. majus* y *A. linkianum*.

2.2 Metodología utilizada

La metodología utilizada en la planta aplica un protocolo desarrollado en el departamento en el ensayo 1º Esterilización y germinación de semillas, introducción de T-DNA en hipocotilos, repicado de plantas a bandeja y transplante a maceta, observación y seguimiento de las plantas. En el ensayo 2º a partir del RIL (recombinant imbred lind) de *A.majus* y *A.linkianun* llegamos a la población F₁ se autopoliniza llegando a la población F₂ se autopoliniza llegando a la población F₃ aquí se realiza un retrocruce con la silvestre 165E llegando a la siguiente población que será objeto de estudio.

3. Resultados y Discusión

Para el ensayo 1º Ya se han obtenido segregantes transgénicas T₁ que resultan de una inserción de T-DNA. Teniendo T₀ unas 65 plantas y T₁ observación de segregantes entre 6 y 10 plantas, en el futuro poner T₂ y observar si se repite el fenotipo mutante e intentar secuenciar usando como anclaje la secuencia de T-DNA insertado en

Figura 1. Población segregante de *Antirrhinum majus*.

el gen. Para el ensayo 2º observar la nueva población para ver el desarrollo de plantas erectas o plantas tapizantes.

4. Conclusiones

En la actualidad se está realizando el seguimiento de las T₂ para el 1º ensayo y la F1 resultante del retrocruce.

5. Agradecimientos

Se agradece al departamento de Genética vegetal la colaboración de todos doctorandos, la utilización de equipos y materiales, y la tutela de los doctores Julia Weiss y Marcos Egea de la UPCT.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J., & Egea-Cortines, M., 2012. Quantitative requirements of Deficiens and Globosa for late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant Journal*, 72, 294-307. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05080.x
- [2] Navarro, P.J., Fernández, C., Weiss, J., & Egea-Cortines, M. 2012. Development of a configurable growth chamber with a vision system to study circadian rhythm in plants. *Sensor*, 12 ((11)), 15365-15375.

Tablas y Figuras



Effect of concentration of IBA during rooting phase in vitro of Limonium sinuatum on the survival and quality of the plant

J. Sánchez^(1,2), A.A. Calderón⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. España.

⁽²⁾ Barberet & Blanc, S.A. Puerto Lumbreras, Murcia. España. E-mail: jesus.tecnologia@hotmail.com

Resumen

La fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* es fundamental por la selección del tipo y concentración de auxina utilizada en el medio de cultivo. Estos dos aspectos tienen consecuencias sobre el rendimiento del proceso, número de plantas aclimatadas, la producción y calidad de las plantas. Este trabajo muestra los resultados del ensayo diseñado para estudiar el comportamiento de cuatro variedades de limonio de distintos colores, Sn09P1, Sn301, Sn349 y Sn08P5, cultivadas en medio Murashige and Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones de ácido indol-3-butírico (IBA) para estimular el enraizamiento. Entre las determinaciones realizadas, se tomaron medidas del porcentaje de esquejes enraizados y del porcentaje de plantas supervivientes en la fase de aclimatación. También se midió la producción, la longitud del tallo, número de espigas por tallo y número de ramificaciones por tallo durante la fase de cultivo en invernadero. Los resultados obtenidos muestran que el efecto que produce la concentración de IBA depende de la variedad estudiada, de manera que para cada una de ellas es posible ajustar aquella concentración que da mayores porcentajes de enraizamiento y supervivencia sin perjudicar a la producción ni a los valores requeridos en los parámetros de calidad estudiados.

Palabras clave: limonio; auxina; aclimatación; producción.

Abstract

The rooting phase in the cultivation *in vitro* of *Limonium sinuatum* is one of the most important steps in the whole process. For this reason it is crucial to select the proper type and concentration of the auxin for its use in culture medium. These two aspects have an impact on process performance, the number of acclimated plants, production and quality of cultivated plants. In this work the results of conducted study of the behavior of four varieties of different colors, "Sn09P1", "Sn301", "Sn349" and "Sn08P5", and cultivated in Murashige Skoog (MS) medium with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) are described. Determination of both the percentage of rooted cuttings and the percentage of surviving plants in the acclimation phase were carried out. Other parameters determinate were the plant's overall production, the length of the stem, number of ears per stem and number of branches per stem during the greenhouse cultivation. The effect produced by the concentration of IBA depends on the studied range so that each of them has been able to adjust to that concentration which gives higher percentages of rooting and survival without impairing the production values or parameters required quality studies.

Keywords: statice; auxin; acclimation; production.

1. Introducción

Limonium sinuatum es una especie de la familia de las Plumbagináceas. Esta planta es muy valorada por el mercado que tiene tanto para flor seca como para flor en fresco.

Esta especie presenta un problema respecto a la propagación masiva de plantas. La producción de *Limonium* se realiza por semilla o esqueje, de forma que para obtener una planta se necesitan entre 6 y 8 meses, con rendimientos bajos (20-30%) y en muchas ocasiones las plantas no presentan homogeneidad. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio

bajo condiciones controladas. Aunque ofrece grandes ventajas, para poder utilizar este método es necesario resolver algunos problemas que pueden limitar los rendimientos. Además, la explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros que, en la mayor parte de los casos, debe hacerse cultivar por cultivar. Entre los factores que se deben tener en cuenta se incluyen el método de establecimiento [1,2], la elección del método de cultivo, el ajuste de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3,4], la posible aparición de hiperhidricidad, etc.

La empresa Barberet & Blanc, S.A., situada en Puerto Lumbreras (Murcia), se dedica, entre

otras actividades, a la mejora genética y a la obtención de nuevas variedades de *Limonium sinuatum*. Una parte importante de su esquema productivo está basado en el cultivo *in vitro* de la especie, por lo que es necesario depurar la técnica de micropropagación en todas las fases que comprende el proceso con el fin de conseguir suficientes plantas con la calidad apropiada para obtener la máxima rentabilidad.

En este trabajo se describe el ensayo realizado con cuatro variedades de limonio de diferentes colores, Sn09P1 (rosa fuerte), Sn301 (violeta), Sn349 (amarillo) y Sn08P5 (rosa claro), durante la fase de enraizamiento *in vitro*, con el objetivo de conocer el efecto que produce la concentración de IBA sobre la fase de enraizamiento, aclimatación y cultivo. Esto es importante, ya que uno de los problemas habituales con esta especie es la baja tasa de enraizamiento. Por otro lado, también se evaluó efecto de los tratamientos sobre la supervivencia tras la aclimatación y durante la fase de cultivo de estas variedades. El fin último es conseguir altos porcentajes en las dos primeras fases (> 85%), obteniendo valores altos en los parámetros de producción y de calidad durante el cultivo.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizaron plantas multiplicadas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades Sn09P1, Sn301, Sn349 y Sn08P5 que estaban en la fase de enraizamiento.

En esta fase de enraizamiento se utilizó un medio de cultivo con la concentración de macro- y micronutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962) [5] y suplementado con un 3 % (p/v) de sacarosa, y diferentes concentraciones de ácido indol-3-butírico (IBA). Posteriormente, el pH de los medios se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9 % (p/v). El medio se distribuyó en tubos de ensayos y éstos se autoclavaron a 104 KPa y a 121 °C durante 20 min. Todos los cultivos se mantuvieron a 23°C y un fotoperiodo de 16 h.

2.2 Tratamientos

Para estudiar el efecto de la concentración de IBA se establecieron tres tratamientos para cada una de las variedades. En el tratamiento 1 (T-1) el medio de cultivo tenía una concentración de 1 mg/L (control), el tratamiento 2 (T-2) tenía 3 mg/L de IBA en el medio de cultivo y el tratamiento 3 (T-3) llevaba 5 mg/L de IBA.

2.3 Diseño y análisis estadístico

En este ensayo se cultivaron 20 plantas por variedad y tratamiento. Se realizaron tres repeticiones. La duración de las fases de enraizamiento, de aclimatación y de cultivo fue de 35 días, de 45 días y de 5 meses, respectivamente. En la fase de enraizamiento se tomaron medidas del porcentaje de esquejes enraizados a los 20 y 35 días. En fase de aclimatación se anotaron datos del porcentaje de plantas supervivientes. Durante la fase de cultivo se tomaron medidas sobre la producción (tallos/planta), longitud del tallo (cm), número de espigas por tallo y nº de ramificaciones por tallo, determinando así la calidad agronómica y comercial. Todos los datos recogidos fueron estudiados con un análisis de la varianza (ANOVA).

3. Resultados y Discusión

3.1 Enraizamiento y aclimatación

El porcentaje de esquejes enraizados y de plantas aclimatadas para la variedad Sn09P1 fue del 100% para todos los tratamientos (Tabla 1). Para la variedad Sn301 el número de esquejes que presentaron raíces aumentó de forma significativa a medida que aumentó la concentración de IBA en el medio, pasando de un 12% para el T-1, a un 71% y a un 87% para T-2 y T-3, respectivamente (Tabla 2). Sucedió lo mismo en esta variedad para el porcentaje de plantas aclimatadas. En cuanto a Sn349 se observó que los porcentajes de esquejes enraizados fueron altos (Tabla 3), sin embargo si se vieron diferencias significativas respecto al porcentaje de plantas supervivientes después de la aclimatación, mostrando el valor más alto el tratamiento el T-3. Respecto al comportamiento de la variedad Sn08P5, se puede ver que el porcentaje de esquejes aumentó al aumentar la concentración de hormona en el medio, llegando al 100% en T-2 y T-3, sin embargo se observó una bajada en cuanto al porcentaje de plantas aclimatadas a subir la concentración de auxina en el medio, bajando incluso hasta el 70% en el T-3 (Tabla 4).

3.2 Producción y parámetros de calidad

La producción en todas las variedades ensayadas no presentó diferencias significativas entre los tratamientos realizados (Fig.1). El T-2 mostró producciones más altas, excepto en Sn08P5, donde el T-1 fue el tratamiento con mayor producción. En cuanto a la longitud del tallo, se puede apreciar en la Fig. 2 que el T-1 fue el que presentó los tallos más largos, y solamente en la

variedad Sn09P1 se observaron diferencias significativas entre tratamientos. También se observó que para Sn301 el T-3 mostró una longitud de tallo por debajo de la requerida (60 cm) para ser considerado de calidad extra (Fig. 2). Con respecto al número de espigas por tallo (Fig. 3), el comportamiento dependió de la variedad, pero este parámetro se encontró siempre por encima del mínimo requerido (6 espigas/tallo). Solamente Sn301 en el T-2 presentó un valor bajo, mostrando además diferencias significativas con los otros tratamientos. En las demás variedades no hay diferencias significativas entre tratamientos para este parámetro. El número de ramificaciones por tallo debe estar por encima de 3, y se puede observar en la Fig. 4 que para todas variedades se obtuvo este valor, y no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

4. Conclusiones

En la variedad Sn09P1 se aprecian buenos porcentajes de enraizamiento y aclimatación con independencia del tratamiento utilizado. Por otro lado, debido a que la longitud del tallo es mayor en el tratamiento de 1 mg/L de IBA, se considera continuar con este tratamiento para esta variedad.

Para la variedad de color violeta Sn301, los porcentajes de enraizamiento y aclimatación mejoran para los tratamientos T-2 y T-3 con respecto al control. Sin embargo, debido a la disminución en la longitud del tallo en el tratamiento T-3, se considera mejor el T-2 de 3 mg/L de IBA.

En la variedad Sn349, de color amarillo, se mejora el porcentaje de plantas con raíces y aclimatadas al aumentar la concentración de IBA. Por otro lado, en medios con la concentración de 5 mg/L de IBA (T-3) se aprecia una bajada en la producción. Por tanto, para esta variedad se considera que se puede utilizar el tratamiento T-2.

Para la variedad Sn08P5, los porcentajes de enraizamiento aumentan y los de aclimatación disminuyen al aumentar las concentraciones de IBA. Además, como en ninguno de los parámetros de calidad estudiados se aprecian diferencias significativas, se considera conveniente continuar con el tratamiento T-1 (control).

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] Igawa, T., Hoshino, Y. & Mii, M. 2002. Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. In Vitro Cell Dev-Pl. 38: 157-162.
- [2] Jeong, J.H., Murthy, H.N. & Paek, K. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. Plant Cell Tiss. Org. 65: 123-128.
- [3] Xiao, Y. & Kozai, T. 2006. In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. Sci. Hort-Amsterdam. 109: 71-77.
- [4] Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J.C., & Mosquera, T. 2007. Evaluation of different concentrations of some plant regulators on *in vitro* multiplication and rooting of *Limonium* var. Misty Blue. Agron. Colomb. 25: 47-53.
- [5] Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Enraizamiento y aclimatación de Sn09P1

Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	100	100
T-2	100	100
T-3	100	100

Tabla 2. Enraizamiento y aclimatación de Sn301

Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	12	62
T-2	71	81
T-3	87	85

Tabla 3. Enraizamiento y aclimatación de Sn349

Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	87	53
T-2	100	78
T-3	100	93

Tabla 4. Enraizamiento y aclimatación de Sn08P5

Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	0	100
T-2	100	90
T-3	100	70

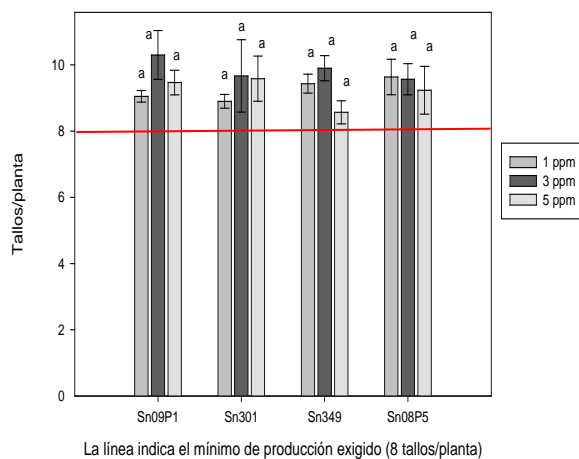


Figura 1. Efecto de la concentración de IBA sobre la producción de las variedades.

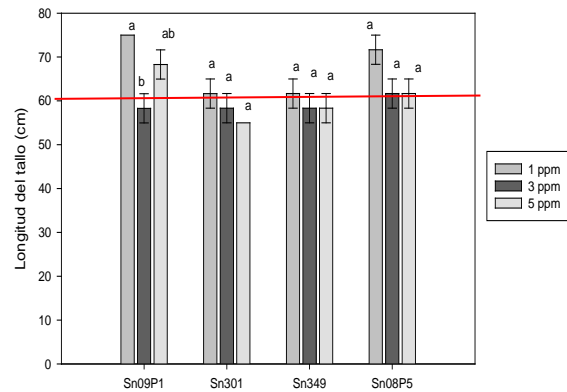


Figura 2. Efecto de la concentración de IBA sobre la longitud del tallo de las variedades.

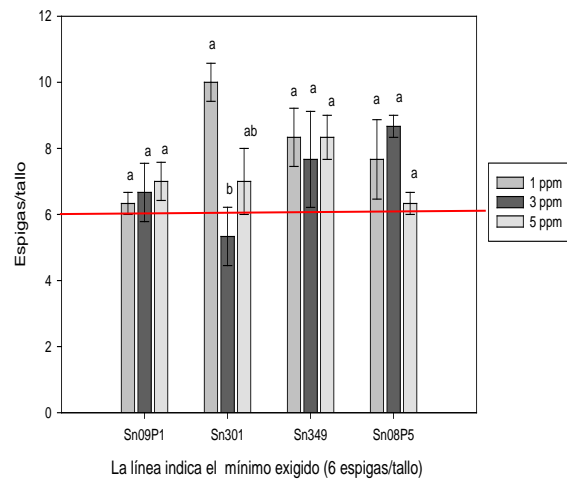


Figura 3. Efecto de la concentración de IBA sobre el número de espigas por tallo.

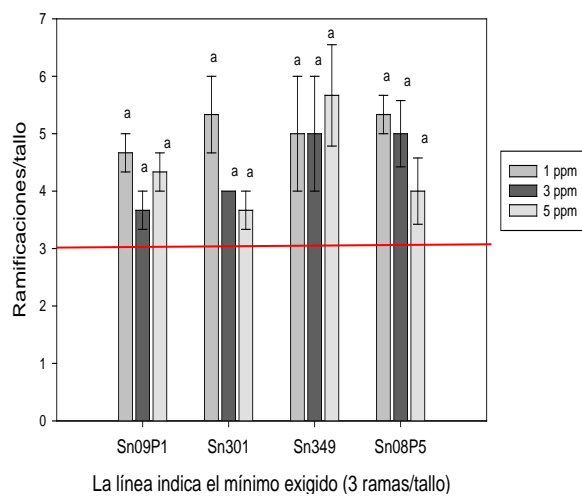


Figura 4. Efecto de la concentración de IBA sobre el número de ramificaciones por tallo.

Quantitative evaluation of bias in PCR amplification and Next Generation Sequencing derived from metabarcoding samples

M. Pawluczyk⁽¹⁾, J. Weiss⁽¹⁾, M.G. Links⁽²⁾, M.E. Aranguren^(3,4), M.D. Wilkinson⁽³⁾, M. Egea-Cortines⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dirección Genetics, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202, Cartagena, Spain, e-mail: marta.pawluczyk@gmail.com

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

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

⁽⁴⁾ Genomic Resources, Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, Faculty of Science and Technology, University of Basque Country (UPV/EHU), Sarriena auzoa z/g, 48940 Leioa - Bilbo, Spain

Abstract

Unbiased identification of organisms by PCR reactions using universal primers followed by DNA sequencing assumes positive amplification. We used six universal loci spanning 48 plant species and quantified the bias at each step of the identification process from end point PCR to Next-Generation Sequencing. End-point amplification was significantly different for single loci and between species. Quantitative PCR revealed that Cq threshold for various loci, even within a single DNA extraction, showed 2000-fold differences in DNA quantity after amplification. Next Generation Sequencing (NGS) experiments in nine species showed significant biases towards species and specific loci using adaptor-specific primers. NGS sequencing bias may be predicted to some extent by the Cq values of Q-PCR amplification.

Keywords: Q-PCR, Ion torrent; Cq value; PCR efficiency

1. Introduction

Sequence analysis of complex DNA samples, such important in population and biodiversity studies, base on universal genomic sequences “barcodes”. These sequences are informative regarding the species composition of the sample, as they contain sufficient polymorphisms between species that taxonomic discrimination becomes possible [1]. This approach constitutes a mainstream technique in species identification. In plants, seven chloroplast loci have been analyzed as potential barcodes, the spacers *atp-atph*, *trnH-psbA*, and *psbK-psbL*, and the genes *matK*, *rbcl*, *rpoB*, *rpoC1* [2,3]. Metabarcoding involves DNA amplification of barcode loci from mixed samples, followed by Next-Generation Sequencing (NGS) in order to identify specific taxa. Most often, the objective of these analyses is to arrive at a quantitative measure of the relative abundance of the various species in the sample.

Unfortunately this widely applied tool is subject to a wide variety of potential biases that can be grouped in three categories related to: 1 – the differential barcode amplification success as a result of the barcode’s universal primers, 2 - the

efficiency of the amplification reaction, which may differ from species to species based on the sequence composition of their specific variant of the barcode, 3 - the preparation of DNA libraries for sequencing.

Despite knowing that these potential biases exist, the degree to which each source of bias affects the outcome of a metabarcoding experiment have not been well quantified. Moreover, by quantifying these biases and relating them to the specific sequences being studied, it may be possible to formulate approaches for post facto normalization of metabarcode data to better-reflect the population make-up.

The present study, therefore, aims to first quantitatively analyze PCR success and evaluate amplification efficiency and Cq values (a relative measure of the predicted concentration of the target amplicon in a PCR reaction [4]) as a tool for predicting amplification success. In this study, we undertake a survey of six well-known plant barcoding markers and apply them to 48 species from 34 different plant families. In addition, we apply the Ion Torrent sequencing method simultaneously for mixed species PCR products of three barcoding primers *rbcl*, *rpoB* and *rpoC1*

starting with equal amounts of PCR products, to quantitatively measure the bias introduced by this step of the metabarcoding study.

Our results reveal that quantitative interpretation of metabarcoding data based on read-abundance is fraught with potential, serious biases.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

Plant material (48 plant species from 33 different families) was gathered from the local fruit market, field sampling, botanical records and our own collections.

2.2 DNA extraction and real-time PCR

Two independent genomic DNA samples were extracted from fresh leaf using the commercial kit 'Plant NucleoSpin' (Machery and Nagel, Germany). All extracted samples were diluted in order to have identical concentrations. Single species reactions were performed from the two independent DNA extractions with three technical replicas for a total of six PCR reactions per species. Real-time PCR reactions were performed as described previously [5]. The primers used in this experiment (*rbcl-a*, *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnL-F*, *trnH-psbA*) have been described previously [2].

Equal amounts of genomic DNA from three species were used to create the mixed-species metabarcoding templates. Sequencing reactions comprised nine species.

2.3 qPCR efficiency and C_q calculation

qPCR efficiency and C_q were computed using qpcR, R package. Efficiency value (E) was calculated as $E_{cpD2} = F(cpD2)/F(cpD2) - 1$ [6].

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

PCR products for *rbcl-a*, *rpoC1* and *rpoB* primers from mixed genomic DNAs were pooled equivalently to yield a final amount of 100ng. Preparation of samples for library construction and sequencing were performed using the Ion Torrent Next generation sequencing Kits (Life Technologies, USA). Briefly PCR products were fragmented using the Ion Shear Plus reagent to a fragment size of 200 bp. The corresponding fragments were ligated to adaptors and size fractionated using E-Gel electrophoresis, obtaining fragments of average 330bp. Emulsion

PCR was performed using One-touch system and sequencing was performed using 314 Ion Torrent chips. A total of 333,274 reads were computationally analyzed in order to identify species origin of each fragment by aligning the reads with a library of known Chloroplast sequences using Bowtie2 [7]. We extracted from the resulting SAM file a map of reads to the known chloroplast sequences using a Perl script from the mPuma pipeline [8].

3. Results and discussion

3.1. Suitability of barcodes and qPCR parameters for specific barcodes depending on plant species

Our first analysis assessed PCR success. It varied both between barcode markers, and between the 48 plant species tested. Barcode primers for the *matK* gene were the least successful, giving positive results in only 50% of the tested species, followed by *rbcl* which amplified in 82% of species. The low PCR success, in case of *matK* with 50% PCR failure in a screening of 48 species, is probably due to lack of similarity between primer and template, since no highly conserved sites flanking the most variable parts of this barcoding marker exist [3]. The *rpoB* and *rpoC1* genes as well as the short intergenic spacers *trnL-F* and *trnH-psbA* proved to be the most universally successful barcoding markers, amplifying in close to 90% of the investigated species.

The second phase of the analysis addressed whether end point PCR results are the outcome of PCR efficiency. As shown in Fig. 1, amplification efficiency during q-PCR varied between barcode markers. The highest average efficiency, based on amplification from all species, corresponded to the markers *trnL-F* and *trnH-psbA*. The *matK* barcode showed the lowest average efficiency among all species. The efficiencies of *matK*, *rbcl* and *rpoC1*, but not *rpoB* and *trnH-psbA*, were significantly different from high-efficiency marker *trnL-F* ($p < 0.0001$ for *matK* and *rbcl* and $p = 0.0013$ for *rpoC1*).

Looking at intra-species variation for all barcodes, C_q values varied widely also in this case (Fig. 2). In *O. sativa*, the difference in C_q between *matK* (28.55) and *trnL-F* (11.93) is extremely large. If one were to apply the delta-CT formula [9], and assumed an average efficiency for both markers (efficiency = 1.9), the predicted differences in starting DNA level would be 2116-fold based on the estimates from these two barcodes.

Cq values also varied significantly among species considering all six markers together and these differences did not correlate with the average efficiency of the PCR amplification. For example, *Z. mays* exhibited an average efficiency over all barcodes of 1.88 ± 0.08 and an average Cq of 30.76 ± 4.67 , while *Solanum tuberosum* exhibited a similar average efficiency of 1.86 ± 0.15 , yet had a Cq of 15.98 ± 5.30 .

Our results show that differences in PCR efficiency do not relate to the corresponding Cq values as measure of PCR success. The Cq values in contrast, proved to be a valuable parameter for the estimation of PCR success as *matK* and *rbcL* showed the highest Cq values during qPCR. The late take-off in the qPCR assay for *rbcL* and *matK* probably reflect an excess of mismatches between primers and templates as Cq values also varied significantly among species over the whole range of markers that may be related to DNA quality and/or PCR inhibiting substances contained in the sample.

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

3.3. Biases during pre-amplification and during emulsion PCR

The identification of genomic DNAs corresponding to different organisms in environmental samples requires sequencing of barcode-PCR products. Not all barcodes successfully amplify in each species. The results of simultaneous sequencing of equal amounts of PCR products from mixed species templates amplified with barcode markers, *rbcL*, *rpoB* and *rpoC1* reveal a strong bias in the number of reads corresponding each species contained in the equimolar starting sample. In the case of marker *rpoB*, most reads (95%) corresponded to *Solanum tuberosum* and only 0.02% to *Zea mays*. The number of reads was not related to the PCR efficiencies of the species, but was related to their Cq values when amplified separately.

Analysis of read numbers also showed a strong bias in the number of total reads corresponding to each of the barcodes. Although equal amounts of PCR product from pre-amplification were used to create the amplicon library, only 11.2% of all reads were identified as *rbcL* fragments, 36.5% as *rpoB* fragments and 52.3% as *rpoC1* fragments. These results are significantly different from an expected 33.3%

per reaction (Chi-square test $p < 2.2 \times 10^{-16}$). The relative percentages in read number proved independent of PCR efficiencies of the specific markers but correlated with average Cq values of the marker for the three species amplified.

As emulsion PCR for NGS sequencing is performed with primers that correspond to ligated adaptors, and nevertheless a relationship between Cq values and final number of reads is maintained, we can conclude that the main bias that can be encountered in metabarcoding projects is related to the specific sequence of the barcode fragment. This seems to be independent of any primer-specific effect such as internal priming, etc., as it is consistent over two different primer pairs. Library construction can produce at least 4.6 fold differences when comparing *rbcL* against *rpoC1*.

4. Conclusions

Our results show that bias existing in PCR amplification and NGS can interfere with correct, especially quantitative, analysis of metabarcoding samples. As such, further improving the reliability of amplification, and utilization of sequence content features to derive and apply quantitative data-normalization algorithms, are certainly areas of significant interest for future development in metabarcoding and NGS analysis.

5. Acknowledgments

This work was funded by the Comunidad Autónoma de la Región de Murcia Project “Molecular markers in conservation and management of the flora of Murcia Region”. This work was published in Analytical and Bioanalytical Chemistry (407(7): 1841-8)

6. References

- [1] Hajibabaei M., Singer G., Hebert P., Hickey D. 2007 DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends Genet 23:167–172.
- [2] Hollingsworth P., Forrest L., Spouge J., et al. 2009 A DNA barcode for land plants. Proc Natl Acad Sci U S A 106:12794–12797
- [3] Kress W., Erickson D. 2007 A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS One 2:e508.

[4] Schmittgen T., Livak K. 2008 Analyzing real

time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3:1101–1108.

[5] Mallona I., Weiss J., Egea-Cortines M. 2011 pcrEfficiency: a Web tool for PCR amplification efficiency prediction. BMC Bioinformatics 12:404.

[6] Spiess A.-N., Feig C., Ritz C. 2008 Highly accurate sigmoidal fitting of real-time PCR data by introducing a parameter for asymmetry. BMC Bioinformatics 9:221.

[7] Polz M., Cavanaugh C. 1998 Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol 64:3724–3730.

[8] Links M., Chaban B., Hemmingsen S., et al. 2013 mPUMA: a computational approach to microbiota analysis by de novo assembly of operational taxonomic units based on protein-coding barcode sequences. Microbiome 1:23

[9] Schmittgen T., Livak K. 2008 Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3:1101–1108

Tables and Figures

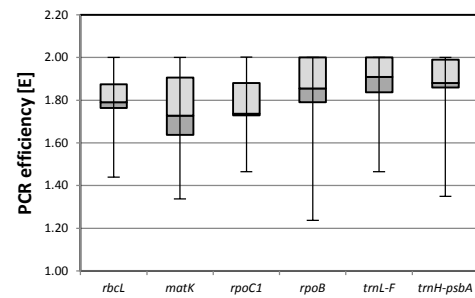


Figure 1. Boxplot of PCR efficiency data for six barcoding markers derived from qPCRs of 48 plant species. The graphic shows only successful amplification data with an efficiency >1

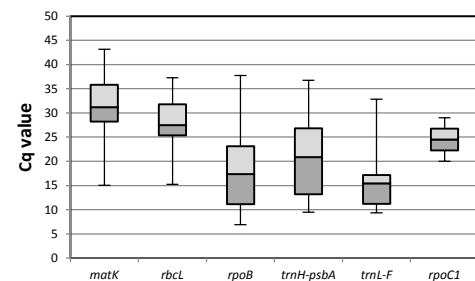


Figure 2. Boxplot of Cq values for six barcoding markers derived from qPCRs of 48 plant species



ORAL SESSION III
Vegetal Production
Technology and
Engineering

Influence of Phragmites australis on the seasonal evolution of biogeochemical conditions (pH/Eh) and N cycling in eutrophic wetlands

M.C. Tercero-Gómez⁽¹⁾, J. Álvarez-Rogel⁽¹⁾, M.I. Arce⁽²⁾, M.J. Delgado⁽³⁾, H.M. Conesa⁽¹⁾, I. Párraga-Aguado⁽¹⁾, M.N. González-Alcaraz^(1,4)

⁽¹⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Edafología y Química Agrícola. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, Cartagena, 30203 Murcia, España. E-mail: carmen.tercero@upct.es

⁽²⁾ Department of Ecohydrology. Libniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (IGB). Müggelseedamm 301, 12587, Berlin, Germany.

⁽³⁾ Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología. Facultad de Química. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100, Espinardo, Murcia, España.

⁽⁴⁾ Department of Ecological Science. Faculty of Earth and Life Sciences. VU University Amsterdam. De Boeleaan 1085, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar en qué medida humedales eutrofizados, en presencia y ausencia de *Phragmites australis*, actúan como depuradores de NO₃⁻ y productores de N₂O (gas de efecto invernadero). Para ello se realizó un experimento en mesocosmos con suelo y plantas de *Phragmites*, que se sometieron a seis períodos de inundación-deseccación durante doce meses con aguas de distinta composición: alta carga (200 mg·L⁻¹ NO₃⁻) y baja carga (20 mg·L⁻¹ NO₃⁻) de nutrientes. Los tratamientos ensayados fueron: sin planta+baja carga; sin planta+alta carga; con planta+baja carga; con planta+alta carga. Se monitorizó Eh y pH, y se analizó la concentración de NO₃⁻ y NH₄⁺ en la solución edáfica así como el N₂O desprendido a la atmósfera. Todos los tratamientos fueron efectivos en la retirada de NO₃⁻ del agua (>70%) lo que acarree la emisión de elevadas cantidades de N₂O a la atmósfera. *Phragmites* contribuyó a reducir las emisiones de N₂O durante las fases de secado al favorecer la retirada de NO₃⁻ del agua y disminuir su disponibilidad para ser transformado en gas vía desnitrificación. Por tanto, la presencia de planta en los suelos de los humedales puede contribuir a que se reduzca la emisión de N₂O a la atmósfera.

Palabras clave: potencial redox; amonificación; nitrificación; desnitrificación.

Abreviaturas: Eh (potencial redox). COD (carbono orgánico disuelto).

Abstract

The aim of the study was to assess to what extent eutrophic wetlands, with and without *Phragmites australis*, act as sinks of NO₃⁻ and as sources of N₂O (greenhouse gas). A one-year mesocosms experiment, with alternating flooding-drying conditions, was performed with soil and plants of *Phragmites*. Two types of water were used: one with high nutrient load (200 mg·L⁻¹ NO₃⁻) and another one with low nutrient load (20 mg·L⁻¹ NO₃⁻). The treatments assayed were: no plant+low nutrient content; no plant+high nutrient content; plant+low nutrient content; plant+high nutrient content. The Eh and pH were monitored, and the concentration of NO₃⁻ and NH₄⁺ in the soil solution and of evolved N₂O were analyzed. All the treatments were effective in the removal of NO₃⁻ from water (>70%), leading to the emission of high amounts of N₂O into the atmosphere. The presence of *Phragmites* favored lower N₂O emissions mainly during drying phases due to a higher reduction of NO₃⁻ concentrations in water, decreasing its availability to be transformed into gas via denitrification. Therefore, the presence of plant in wetland soils may contribute to reduce the emission of N₂O into the atmosphere.

Keywords: redox potential; ammonification; nitrification; denitrification.

1. Introducción

Los humedales son sistemas altamente efectivos en la depuración de aguas con elevadas concentraciones de NO₃⁻ [1,2]. Conocer la relación entre la cantidad de NO₃⁻ retirado de un agua eutrofizada y el N₂O emitido durante la desnitrificación ayuda a valorar el balance entre

algunos aspectos positivos (depuración de aguas eutrofizadas) y negativos (emisión de gases de efecto invernadero) de los humedales.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1.- Determinar en qué medida la presencia o no de planta, la carga de nutrientes del agua y los períodos de inundación-deseccación influyen en la

capacidad de los humedales para actuar como depuradores de altas concentraciones de NO_3^- , es decir, como filtros verdes. 2.-Determinar en qué medida el desprendimiento de N_2O está influenciado por la carga de nutrientes de agua y si esto está relacionado con la presencia o no de planta y con los ciclos de inundación-desección.

2. Materiales y Métodos

El experimento se realizó en 12 mesocosmos (100x50x50 cm) situados dentro de un invernadero que se rellenaron con una capa de 15 cm arena en el fondo (horizonte subsuperficial) y, sobre ella, 25 cm de suelo salino de textura fina (horizonte superficial). En 6 de los mesocosmos se colocaron plantas de *Phragmites australis*. Tanto los suelos como las plantas utilizadas fueron recogidas de un humedal de la costa del Mar Menor, la Marina del Carmolí. Los mesocosmos se sometieron a 6 periodos de inundación-desección a lo largo de 12 meses con agua de alta ($\text{NO}_3^- \sim 200 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{PO}_4^{3-} \sim 10 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{COD} \sim 100 \text{ mg L}^{-1}$) y baja (concentraciones 10 veces menor) carga de nutrientes. Los tratamientos ensayados fueron: sin planta+baja carga de nutrientes; sin planta+alta carga de nutrientes; planta+baja carga de nutrientes; planta+alta carga de nutrientes. Regularmente se monitorizaron el Eh, pH y T° , y se recogieron muestras de agua de poro para el análisis de diversas formas de N. También se tomaron muestras de los gases emitidos desde la superficie del suelo para medir las concentraciones de N_2O desprendido a la atmósfera. Para conocer más detalles ver [3].

3. Resultados y Discusión

Las Fig. 1, 2 y 3 muestran una síntesis de los resultados obtenidos. El sistema Eh/pH estuvo influenciado por los cambios en el estado de saturación del suelo y por la presencia-ausencia de planta, pero no por la carga de nutrientes del agua, y dicha respuesta varió en función de la profundidad. La evolución del Eh indicó que la

5. Agradecimientos

Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Referencia CGL2010-20214).

6. Referencias bibliográficas

[1] González-Alcaraz, M.N. 2012. Dynamics of nitrogen, phosphorus and metals in eutrophic wetlands affected by mine wastes. Effects of

actividad microbiana fue mayor en superficie donde se alcanzaron valores por debajo de 0 mV durante los periodos de inundación, independientemente de la presencia de planta (Figura 1). *Phragmites* favoreció la aireación y entrada de O_2 en profundidad, con valores de Eh alrededor de +400 mV excepto en verano (con T° máxima en el suelo $\approx 30 \text{ }^\circ\text{C}$), cuando el Eh bajó hasta -200 mV.

Los picos de N_2O detectados al inicio de las inundaciones (Figura 2), sobre todo en los tratamientos con alta carga de nutrientes, indicaron una fuerte desnitrificación (reducción de NO_3^- a N_2O y N_2 en un rango de $\approx +350 < \text{Eh} < \approx +100 \text{ mV}$). Hacia la mitad y el final de las inundaciones la desnitrificación estuvo inhibida, como se evidenció por el aumento de la concentración de NH_4^+ (Figura 1) procedente de la amonificación (formación de NH_4^+ durante el primer paso del proceso de mineralización del nitrógeno orgánico). Durante los secados la concentración de NH_4^+ disminuyó mientras que la de NO_3^- aumento (Figura 1) debido al proceso de nitrificación (oxidación de NH_4^+ a NO_3^-). Los picos de N_2O producidos durante algunas fases de secado (Figura 2) se pueden atribuir a que una fracción de dicho gas pudo quedar atrapado en los poros saturados del suelo y ser desprendido al secarse éste.

Para todos los tratamientos ensayados, los porcentajes de reducción de NO_3^- del agua fueron elevados (>70%). Durante las fases de inundación *Phragmites* no pareció jugar un papel relevante en las emisiones de N_2O , pero en los secados la tendencia fue a que los tratamientos con planta tuvieran menos emisiones (Figura 3). Esto se atribuye a la retirada de NO_3^- por parte de la planta durante las fases de secado.

4. Conclusiones

La presencia de vegetación puede tener un efecto positivo para reducir las emisiones de N_2O a la atmósfera al contribuir a reducir las concentraciones de NO_3^- en el agua.

liming on plant growth and metals mobility. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena, España.

[2] González-Alcaraz, M.N., Conesa, H.M., Álvarez-Rogel, J. 2013. Nitrate removal from eutrophic wetlands polluted by metal-mine wastes: Effects of liming and plant growth. J. Environ. Manage. 128: 964-972.

[3] Tercero-Gómez, M.C., Álvarez-Rogel, J., González-Alcaraz, M.N. 2014. Ciclos biogeoquímicos en humedales con diferente grado de eutrofización y su relación con factores de cambio climático: resultados experimentales en mesocosmos. En: Actas del III Workshop en

Investigación Agroalimentaria – WiA14. Ed: TAIDA-UPCT. Cartagena, España. Pag: 258.

Figuras

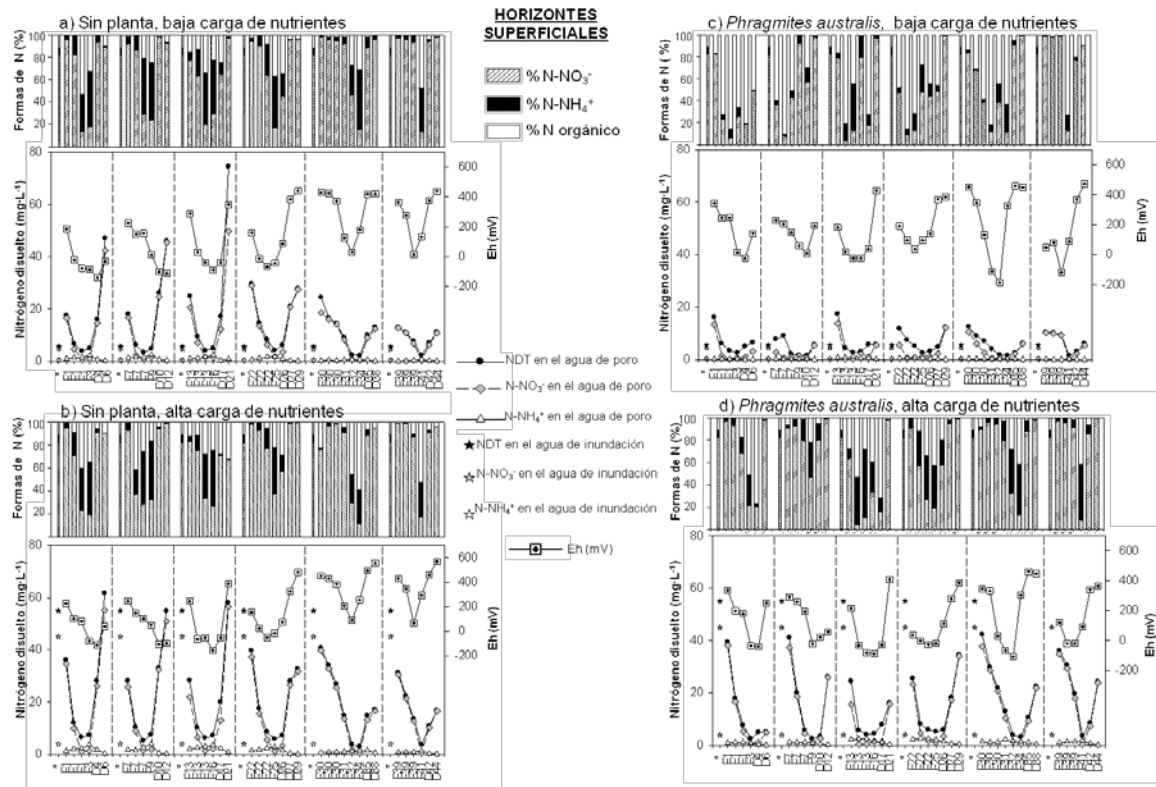
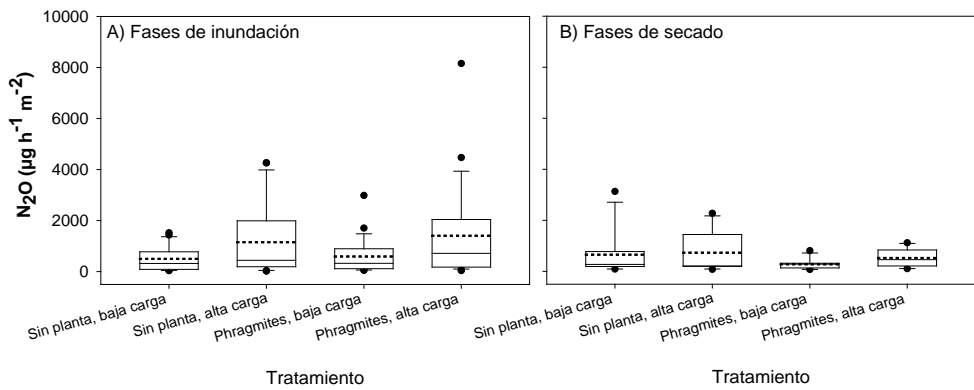
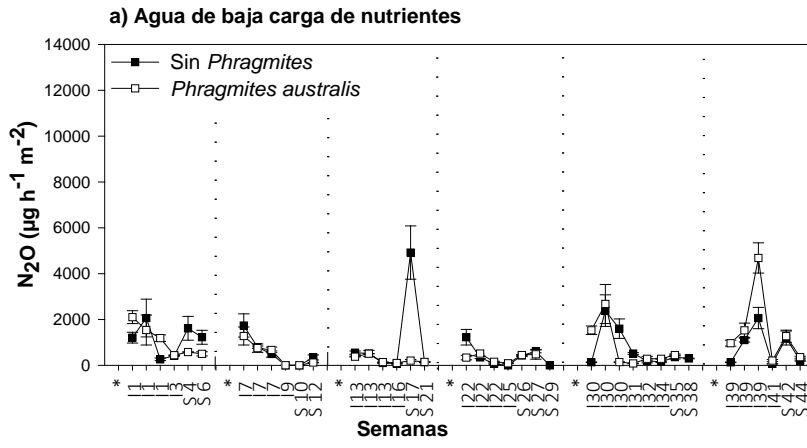


Figura 1. Relación entre Eh (mV) y las formas de N en la solución del suelo de los horizontes superficiales de los tratamientos ensayados. Encima de cada gráfica se presenta un gráfico de barras con los porcentajes de las diferentes formas de N. En el eje X aparecen las semanas del experimento. Se designa con F las semanas de inundación y con D las de secado, y con un número después de la letra se indica la semana del experimento (por ejemplo, D17 designa a la semana 17 que correspondió a una semana de secado). El símbolo * designa el momento en que se inundaron los mesocosmos (inicio de cada ciclo de inundación). NDT (N disuelto total).



los
s
, y
7
el

Evolution of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance to diamide insecticides over the last 5 years

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

Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena. lidiaGV_ct@hotmail.com

Resumen

La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, es una de las plagas más importantes en el cultivo del tomate. Actualmente, el control químico sigue siendo esencial para controlar a esta plaga. Las diamidas son un grupo nuevo de insecticidas que apareció hace unos años como alternativa química de control de varias plagas agrícolas, entre ellas *T. absoluta*. En este trabajo se ha comparado la evolución de la resistencia de poblaciones de *T. absoluta* a las diamidas: clorantraniliprol, flubendiamida y ciantraniliprol. En los resultados se observa que una población de Sicilia (Italia) ha desarrollado resistencia a las tres diamidas, con porcentajes de resistencia muy altos para clorantraniliprol (x1000) y flubendiamida (x1250), y menor para ciantraniliprol (x151). Por tanto, existe una posible resistencia cruzada entre clorantraniliprol y flubendiamida, y en menor medida para ciantraniliprol.

Palabras clave: Clorantraniliprol; flubendiamida; ciantraniliprol; rynaxypyr; cyazypyr.

Abstract

The tomato borer, *Tuta absoluta*, is one of the most important pests in tomato crops. Currently, chemical control is still essential to control this pest. Diamides are a new group of insecticides that appeared as an alternative to chemical control of several agricultural pests a few years ago, including *T. absoluta*. This study compared the evolution of resistance of *T. absoluta* populations to the diamides: chlorantraniliprole, flubendiamide and cyantraniliprole. The results show that a population from Sicily (Italy) has developed resistance to all three diamides, with very high resistance rates for chlorantraniliprole (1000-fold) and flubendiamide (1250-fold), and lower for cyantraniliprole (151-fold). Therefore, possible cross-resistance exists between chlorantraniliprole and flubendiamide, and to a lesser extent to cyantraniliprole.

Keywords: Chlorantraniliprole; flubendiamide; cyantraniliprole; rynaxypyr; cyazypyr.

1. Introducción

La polilla del tomate o gusano minador del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), es nativa de Sudamérica y fue detectada por primera vez en España en el año 2006, concretamente en Castellón [1], desde donde se extendió a todas las áreas de cultivo de tomate en España, y posteriormente a otros países de Europa. En la actualidad, *T. absoluta* es considerada una de las plagas más devastadoras del cultivo del tomate [2]. Las larvas de *T. absoluta* penetran en las hojas de tomate alimentándose del mesófilo y creando galerías, afectando así a la fotosíntesis de la planta (Fig.1). Las larvas también penetran en los tallos y frutos de la planta de tomate [3]. El control químico es el principal método de control utilizado en *T. absoluta*, por lo que es importante estudiar la evolución de la resistencia de esta plaga a los insecticidas autorizados para su control, y así poder desarrollar estrategias anti-resistencia y conocer los mecanismos de resistencia implicados. Las diamidas son un nuevo grupo de insecticidas que han sido clasificados como moduladores del receptor de la rianodina [4]. Hasta la fecha, el grupo de las diamidas lo

componen los siguientes insecticidas: flubendiamida, una diamida del ácido ftálico, y clorantraniliprol y ciantraniliprol, diamidas del ácido antranílico. Si se realiza un uso continuado y conjunto de las diamidas, puede aparecer rápidamente resistencia, lo que limitaría su uso para controlar diferentes plagas, entre ellas *T. absoluta*.

El objetivo de este trabajo es comparar la evolución de la susceptibilidad de poblaciones de *T. absoluta* a clorantraniliprol, ciantraniliprol y flubendiamida, desde el inicio del uso en campo de las diamidas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Poblaciones de *T. absoluta*

Las poblaciones de *T. absoluta* empleadas en este estudio fueron recolectadas de diferentes países Mediterráneos (Tabla 1). En el laboratorio, las poblaciones se mantienen en jaulas de cría con planta de tomate (*Lycopersicon sculentum* cv. Bobcat) para su alimentación, en condiciones controladas de temperatura (25±2°C), humedad relativa (60±5%) y fotoperiodo (16/8 h luz/oscuridad).

2.2 Insecticidas

Las formulaciones comerciales de los insecticidas utilizados en los bioensayos fueron: Altacor 35WG (clorantniliprol (rynaxypyr) 35% p/p, DuPont), Benevia (ciantraniliprol (cyazypyr) 10% p/v, DuPont) y Fenos (flubendiamida 24% p/p, Bayer CropScience).

2.3 Bioensayos de susceptibilidad

Estos bioensayos se llevaron a cabo con larvas de segundo estadio (L2). El método de inmersión de hojas de tomate fue empleado para la realización de los bioensayos [5]. Brevemente, se cortaron las hojas de tomate y se sumergieron en las distintas concentraciones de insecticida, más un control, y posteriormente se pusieron a secar. Cada hoja se colocó en una caja transparente (dimensiones 12x10x5 cm) con algodón saturado de agua en el peciolo de las hojas para evitar su deshidratación, y las larvas L2 se colocaron encima de las hojas. Los bioensayos se realizaron con 3 repeticiones por dosis y 10 larvas por repetición, con un total de 30 larvas por dosis de insecticida. La mortalidad se evaluó tras 72 horas.

2.4 Análisis de los datos

La mortalidad de las larvas fue analizada usando el programa estadístico POLO-Plus. Los parámetros calculados para este estudio fueron: la concentración letal 50 (CL50) y sus límites fiduciales al 95% para cada población e insecticida, y los factores de resistencia (FR) de cada población, comparándola con la población más susceptible.

3. Resultados y Discusión

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de los bioensayos realizados con el insecticida clorantniliprol a lo largo de estos últimos 5 años. Como se puede observar en la tabla, la variabilidad entre poblaciones no ha sido significativa, salvo en el caso de las poblaciones de Sicilia (Italia) y Calnegre (Murcia). En la población de Sicilia se observa una resistencia muy alta, con una CL50 de 47,65 ppm y un FR superior a 1000. Mientras, la población de Calnegre presenta cambios en la susceptibilidad a clorantniliprol, con una CL50 de 1,45 ppm, la cual está aún muy por debajo de la dosis de campo de este insecticida (DC: 35 ppm).

La Tabla 3 presenta los resultados obtenidos de los bioensayos realizados con flubendiamida. Se observa que no hay cambios en la susceptibilidad a este insecticida en las diferentes poblaciones bioensayadas, con excepción de Sicilia, cuya CL50 se estima que es superior a 100 ppm, la cual está por encima de la dosis de campo de flubendiamida (DC: 60 ppm).

Los valores de CL50 a los insecticidas clorantniliprol y flubendiamida para la población de Sicilia concuerdan con los resultados de una reciente publicación donde se presentan los primeros casos de resistencia a diamidas en poblaciones italianas de *T. absoluta* [6].

Por último, en la Tabla 4 se muestran los resultados de los bioensayos con ciantraniliprol. Se observa que la variabilidad entre poblaciones no ha sido significativa, menos para la población de Sicilia, donde se ha observado un cierto grado de resistencia, con una CL50 de 6,94 ppm. Aún así, este valor está muy por debajo de la dosis de campo de ciantraniliprol (DC: 100 ppm).

Con respecto a la población de Sicilia, podemos determinar que hay un desarrollado de resistencia a las tres diamidas estudiadas. Además, se observa una posible resistencia cruzada para los insecticidas clorantniliprol y flubendiamida, pero en el caso de ciantraniliprol, la evidencia de una resistencia cruzada con las otras diamidas es menor.

4. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos, se puede decir que en la actualidad se ha desarrollado resistencia en poblaciones de *T. absoluta* a diamidas en Italia, estando esta resistencia multiplicada por 1000 en el caso de clorantniliprol, y por más de 1250 para flubendiamida. Asimismo, se observa una posible resistencia cruzada ente clorantniliprol y flubendiamida, pero con respecto a ciantraniliprol, la resistencia cruzada con las otras dos diamidas no es tan evidente.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

- [1] Urbaneja A., González-Cabrera J., Arnó J., Gabarra R. 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Manag. Sci.* 68: 1215-1222.
- [2] Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T., Urbaneja A. 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new

threat to tomato world production. J. Pest Sci. 84: 403-408.

[3] Desneux N., Wajnberg E., Wyckhuys K.A.G., Burgio G., Arpaia S., Narváez-Vasquez C.A., González-Cabrera J., Catalán Ruescas D., Tabone E., Frandon J., Pizzol J., Poncet C., Cabello T., Urbaneja A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. J. Pest Sci. 83: 197-215.

[4] IRAC MoA Classification Scheme (Version 7.3.1): <http://www.irac-online.org>.

[5] García-Vidal L., Martínez-Aguirre M.R., Bielza P. 2014. Línea base de susceptibilidad y selección de poblaciones resistentes de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). En: Actas del III Workshop en Investigación Agroalimentaria – WiA14. Ed: TAIDA-UPCT. Cartagena, España. Pág: 101.

[6] Roditakis E., Vasakis E., Grispou M., Stavarakaki M., Nauen R., Gravouil M., Bassi A. 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. J. Pest Sci. 88: 9-16.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Poblaciones de *T. absoluta* bioensayadas.

Población	Origen	Fecha de recogida	Cultivo
Abarán	Murcia (España)	Marzo 2010	Tomate
Almería	Almería (España)	Mayo 2010	Tomate
Canarias	Las Palmas de Gran Canarias (España)	Mayo 2010	Tomate
Níjar	Almería (España)	Mayo 2010	Tomate
Cañada de Gallego	Murcia (España)	Mayo 2010	Tomate
Biancavilla	Sicilia (Italia)	Julio 2010	Tomate
Tudela	Navarra (España)	Septiembre 2010	Tomate
Boavista	Oporto (Portugal)	Septiembre 2010	Tomate
Charneca	Lisboa (Portugal)	Septiembre 2010	Tomate
Águilas	Murcia (España)	Enero 2011	Tomate
Foggia	Foggia (Italia)	Marzo 2011	Tomate
Mazarrón	Murcia (España)	Julio 2012	Tomate
Cañada de Gallego 2	Murcia (España)	Septiembre 2014	Tomate
Villaverde	Mérida (España)	Octubre 2014	Tomate
Calnegre	Murcia (España)	Noviembre 2014	Tomate
Sicilia	Sicilia (Italia)	Diciembre 2014	Tomate

Tabla 2. Evolución de la resistencia de *T. absoluta* a clorantraniliprol (DC: 35)

Año	Población	CL50	LF95%	FR
2010	Abarán	0,21	0,1-0,41	5,1
2010	Almería	0,15	0,08-0,28	3,6
2010	Canarias	0,10	0,07-0,13	2,3
2010	Níjar	0,14	0,05-0,26	3,3
2010	C. de Gallego	0,04	0,02-0,06	1
2010	Biancavilla	0,21	0,08-0,31	5
2010	Tudela	0,07	0,06-0,09	1,7
2010	Boavista	0,09	0,04-0,17	2,1
2010	Charneca	0,23	0,19-0,27	5,5
2011	Águilas	0,18	0,14-0,23	4,5
2011	Foggia	0,06	0,04-0,09	1,4
2012	Mazarrón	0,14	0,09-0,26	3,3
2014	C. de Gallego 2	0,15	0,12-0,2	3,8
2014	Villaverde	0,13	0,07-0,18	3
2014	Calnegre	1,45	1,08-2,06	35,3
2014	Sicilia	47,65	24,5-183,1	1162

* DC: Dosis de campo en ppm. CL50: Concentración Letal 50 en ppm. LF (95%): Límites fiduciales calculados al 95%. FR: Factor de resistencia con respecto a la población más susceptible.

Tabla 3. Evolución de la resistencia de *T. absoluta* a flubendiamida (DC: 60)

Año	Población	CL50	LF95%	FR
2010	Abarán	0,08	0,02-0,14	1
2010	Almería	0,14	0,1-0,2	1,8
2010	Canarias	0,09	0,04-0,18	1,1
2010	Níjar	0,19	0,12-0,27	2,4
2010	C. de Gallego	0,11	0,05-0,23	1,4
2010	Biancavilla	0,09	0,05-0,16	1,2
2010	Tudela	0,17	0,11-0,24	2,1
2010	Boavista	0,17	0,06-0,31	2,1
2010	Charneca	0,13	0,06-0,19	1,6
2011	Águilas	0,10	0,06-0,14	1,3
2011	Foggia	0,20	0,11-0,29	2,5
2014	Sicilia	> 100	-	> 1250

* DC: dosis de campo en ppm. CL50: Concentración Letal 50 en ppm. LF (95%): Límites fiduciales calculados al 95%. FR: Factor de resistencia con respecto a la población más susceptible.

Tabla 4. Evolución de la resistencia de *T. absoluta* a ciantraniliprol (DC: 100)

Año	Población	CL50	LF95%	FR
2010	Abarán	0,09	0,07-0,11	2,0
2010	Almería	0,15	0,07-0,21	3,2
2010	Canarias	0,07	0,06-0,10	1,6
2010	Nijar	0,09	0,05-0,17	2,0
2010	C. de Gallego	0,09	0,04-0,15	1,9
2010	Biancavilla	0,09	0,05-0,14	1,9
2010	Tudela	0,05	0,03-0,07	1
2010	Boavista	0,12	0,07-0,22	2,7
2010	Charneca	0,13	0,08-0,18	2,8
2011	Águilas	0,09	0,07-0,12	2,0
2011	Foggia	0,08	0,05-0,13	1,8
2012	Mazarrón	0,15	0,11-0,19	3,2
2014	C. de Gallego 2	0,13	0,10-0,16	2,8
2014	Villaverde	0,06	0,04-0,08	1,2
2014	Sicilia	6,94	2,34-13,59	151

* **DC:** Dosis de campo en ppm. **CL50:**

Concentración Letal 50 en ppm. **LF (95%):**

Límites fiduciales calculados al 95%. **FR:** Factor de resistencia con respecto a la población más susceptible.



Figura 1. Daño de *T. absoluta* en hoja de tomate.

Genetic variability of tolerance to spinosad and emamectin benzoate in different Mediterranean populations of Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

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

Departamento de Producción Vegetal, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena, España.
E-mail: virginia.balanza@upct.es

Resumen

Orius laevigatus es un enemigo natural usado como agente de control biológico. Uno de los problemas a los que se enfrenta la gestión integrada de plagas (GIP) es la compatibilidad que existe entre enemigos naturales y algunos tratamientos fitosanitarios que se aplican pero esta competencia siempre ha sido estudiada con poblaciones únicas y comerciales, sin profundizar en la variabilidad de las poblaciones silvestres. Partiendo de este punto, se estudiará si existe una variabilidad genética entre varias poblaciones naturales mediterráneas de *O. laevigatus* en su tolerancia a distintos insecticidas. Las materias activas utilizadas fueron spinosad y emamectina benzoato. Existieron diferencias significativas entre las poblaciones ensayadas con spinosad (34,4 veces) y las poblaciones ensayadas con emamectina benzoato (28,8 veces). La concentración letal media (CL₅₀) varió entre 42,7 mg L⁻¹ y 1470,2 mg L⁻¹ para spinosad, con un factor de susceptibilidad (FS) de 34,4, mientras que en el caso de emamectina benzoato la CL₅₀ varió entre 1,1 mg L⁻¹ y 32,8 mg L⁻¹ con FS de 28,8. En general, se puede decir que existió una variabilidad de la tolerancia a insecticidas dependiendo de la población tratada, existiendo poblaciones con una mortalidad baja a la dosis de campo.

Palabras clave: GIP; resistencia a insecticidas; control biológico.

Abstract

Orius laevigatus is a natural enemy which is used as biological control agent. One of the problems that there is in integrated pest management (IPM) is the compatibility between natural enemies and some phytosanitary treatments applied to the plant, but this competition has always been studied with commercial populations without going into in the variability of the natural populations. From this point of view, the genetic variability of tolerance to several insecticides in different Mediterranean populations of *O. laevigatus* was studied. Spinosad and emamectin benzoate were used as active matters. There were significant differences between populations in spinosad assays (34.4 times) and emamectin benzoate assays (28.8 times). The median lethal concentration (CL₅₀) varied between 42.7 mg L⁻¹ and 1470.2 mg L⁻¹ for spinosad and the susceptibility factor (FS) was 34.4. For emamectin benzoate CL₅₀ varied between 1.1 mg L⁻¹ and 32.8 mg L⁻¹ and FS was 28.8. In general, it can be said that there is a variability of tolerance to insecticides depending on the population, existing populations with low mortality field doses.

Palabras clave: IPM; insecticide resistance; biological control.

1. Introducción

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un enemigo natural de muchas plagas de artrópodos pero ha sido usado principalmente en el control biológico del trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) [1]. Este antocórido ha sido usado como agente de control biológico en la protección de cultivos en muchos países europeos [2].

La instalación, establecimiento y posterior distribución en los invernaderos de *O. laevigatus* resulta de vital importancia en el éxito del manejo integrado de plagas [3]. Un principio clave del manejo integrado de plagas es maximizar el control de plagas con depredadores y parasitoides. Estos se complementan en caso

necesario con plaguicidas. Los plaguicidas deben utilizarse de una manera que no afecten a los agentes de control biológico de las plagas. Esto requiere el conocimiento acerca de los productos químicos, los umbrales de pulverización y tiempos de aplicación que son compatibles con los enemigos naturales [4]. Con respecto a *O. laevigatus* se han realizado algunos estudios frente a los efectos de distintos insecticidas [5, 6, 7].

El objetivo de este trabajo es estudiar si existe una variabilidad genética entre distintas poblaciones mediterráneas silvestres de *O. laevigatus* en su tolerancia a distintos insecticidas. Como consecuencia de los resultados obtenidos, se realizará la selección de

una población con una resistencia mejorada para cada uno de estos plaguicidas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Recolección y cría de *Orius laevigatus*

Se recolectaron mediante un aspirador manual un total de 21 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* procedentes de distintos países mediterráneos. Se mezclaron individuos de las distintas poblaciones con la finalidad de obtener una población mezcla con una variabilidad genética diferente. Además como referencia se utilizó una población comercial. Las poblaciones ensayadas en este trabajo fueron: Policoro (Italia), Hellín (Albacete-España), Cuevas de Almanzora (Almería-España), Cabo de Gata (Almería-España), Portonovo (Galicia-España) Moreira (Galicia-España), Acate (Italia) y Samaria (Grecia). Previamente fueron estudiadas otras poblaciones, cuyos resultados se han tenido en cuenta al analizar los datos obtenidos en estos últimos ensayos.

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

2.2 Preparación y lectura de los bioensayos

Se realizaron bioensayos para individuos de las poblaciones recolectadas con dos insecticidas que contenían las siguientes materias activas: spinosad y emamectina benzoato.

Se prepararon las siguientes dosis de insecticida: 30-3000 mg L⁻¹ y 3-100 mg L⁻¹, respectivamente para spinosad y emamectina benzoato. A las dosis preparadas se añadieron secciones de judía de 3 cm. Las judías se agitaron junto con el insecticida y se dejaron secar para posteriormente añadirlas a una salsera que contenía alimento y refugio. En cada salsera se añadieron 10 individuos como mínimo. Se realizaron 3 repeticiones por dosis y un control de 3 repeticiones con judía sin tratar.

El tiempo de duración de los experimentos fue 3 días para spinosad y 7 días para emamectina benzoato y transcurrido este periodo, se procedió a estimar la mortalidad.

2.3 Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa POLO PLUS® usando un análisis Probit. Se calcularon las concentraciones letales (CL₅₀) y los límites fiduciales (LF) al 95% de confianza. Solamente existieron diferencias significativas, cuando los límites fiduciales se solaparon. Posteriormente se calculó la línea base de susceptibilidad y el factor de susceptibilidad natural (FS), teniendo en cuenta todas las poblaciones ensayadas hasta el momento, aunque no aparezcan en este artículo.

3. Resultados y Discusión

Para spinosad (Tabla 1), hubo diferencias significativas entre las poblaciones ensayadas (34,4 veces), variando la concentración letal media (CL₅₀) entre 42,7 mg L⁻¹ y 1470,2 mg L⁻¹. Considerando que la dosis de campo es 120 mg L⁻¹, hubo poblaciones en las que se obtuvo una mortalidad entre 60-80%. Por otro lado, se encontraron tres poblaciones (Cabo de Gata, Cuevas de Almanzora y Samaria) en las que la mortalidad fue menor del 5%. En Cuevas de Almanzora el FS fue de 34,4, mientras que la población más sensible estudiada hasta el momento fue Portonovo, con un FS=1.

Algunos ensayos previos mostraron que spinosad es tóxico para distintas especies de *Orius spp.* [7, 8]. En un estudio realizado por Van de Veire y Tirry [9], se trataron con spinosad a una dosis de 100 mg L⁻¹ ninfas de una población de *O. laevigatus* criados en laboratorio. En el ensayo se observó que este insecticida era altamente tóxico, produciéndose una mortalidad del 100% de los individuos a los 4 días de aplicación. Sin embargo, en la Tabla 1 se muestra que al ensayar, en este caso, distintas poblaciones silvestres de *O. laevigatus*, se observó una variabilidad en los resultados con respecto a la toxicidad de spinosad.

En el caso de emamectina benzoato (Tabla 2), existieron diferencias significativas entre las poblaciones que se muestran en este artículo, variando la CL₅₀ entre 1,1 mg L⁻¹ y 32,8 mg L⁻¹. Siendo la DC=14,25 mg L⁻¹, destacaron las poblaciones de Cuevas de Almanzora y Samaria, con CL₅₀ 32,8 mg L⁻¹ y 23,5 mg L⁻¹, respectivamente y una mortalidad a la dosis de campo del 12,2% para Cuevas de Almanzora y 34,9% para Samaria. Acate con un FS=1 y una mortalidad a la dosis de campo de 97,5%, se mostró como la población más sensible a

emamectina benzoato estudiada hasta el momento.

El mismo estudio que se realizó con spinosad [9], también se hizo con emamectina benzoato, aplicando una dosis de 15 mg L⁻¹ y ninfas de *O. laevigatus*. Se observó que este insecticida era altamente tóxico también en condiciones de laboratorio. Por otro lado, se ensayó en campo una población comercial de *O. laevigatus* [10] a la concentración recomendada como DC (14,25 mg L⁻¹), causando una reducción progresiva de la población a los 3, 7 y 13 días después de la aplicación. En la Tabla 2, se observa que al igual que en spinosad, existe una variabilidad en la tolerancia a emamectina benzoato dependiendo de la población estudiada. En este insecticida se puede observar que la línea base de susceptibilidad es inferior a la DC, por lo que se puede concluir que, en general, y coincidiendo con algunos estudios, *O. laevigatus* es más sensible a emamectina benzoato.

4. Conclusiones

Se concluyó que hubo diferencias significativas para emamectina benzoato y spinosad entre las poblaciones estudiadas. Se puede decir que al ensayar poblaciones naturales de *O. laevigatus*, el efecto de un mismo insecticida varía dependiendo de la población. Estos resultados muestran que existe una variabilidad genética entre poblaciones que hacen a unas poblaciones más resistentes que a otras y abre las puertas para poder seleccionar una población resistente a estos insecticidas.

5. Agradecimientos

Agradecimientos a E. Martínez-Díaz por su inestimable ayuda técnica.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Chambers R.J., Long S., Helyer N.L. 1993. Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the UK. *Biocontrol Sci. Techn.* 3: 295-307.
- [2] EPPO. 2009. European and Mediterranean Plant Protection Organization.
- [3] Urbaneja A., Arán E., León P., Gallego A. 2003. Efecto combinado de altas temperaturas y de humedades en la supervivencia, fecundidad y

Tablas

fertilidad de *Orius laevigatus* y *Orius albidipenis* (Hem: Anthocoridae). *Bol. San. Veg. Plagas.* 29: 27-34.

[4] Delbeke F., Vercruyse P., Tirry L., De Clerco P., Degheele D. 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). *Entomophaga* 42: 349-358.

[5] Biondi A., Desneux N., Siscaro G., Zappala L. 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere.* 87: 803-812.

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

[7] Studebaker GE., Kring TJ. 2003. Effects of insecticides on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) measured by field, greenhouse and Petri dish bioassays. *Florida Entomologist* 86:178-185.

[8] Broughton S., Harrison J., Rahman T. 2013. Effect of new and old pesticides on *Orius armatus* (Gross) - an Australian predator of western flower thrips, *frankliniella occidentalis* (Pergande). Wileyonlinelibrary.com. DOI 10.1002/ps.3565.

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

[10] Amor F., Medina P., Bengochea P., Cánovas M., Vega P., Correia R., García F., Gómez M., Budía F., Viñuela E., López JA. 2012. Effect of emamectin benzoate under semi-field and field conditions on key predatory biological control agents used in vegetable greenhouses. *Biocontrol Sci. Techn.* 22: 219-232.

Tabla 1. Toxicidad de spinosad para 8 poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a	LF (95%) ^b	FS-CL ₅₀ ^c	Mortalidad DC (%) ^d
Policoro	62,2	33,4-95,4	1,5	65,0
Hellín	80,0	30,7-138,6	1,9	60,1
Moreira	64,7	16-148,3	1,5	70,2
Cabo de Gata	808,4	550,1-1142,8	18,9	3,1
Cuevas de Almanzora	1470,2	1076,1-1896,0	34,4	0,0
Samaria	364,5	224,7-644,6	8,5	4,3
Acate	225,8	52,2-757,8	5,3	40,9
Portonovo	42,7	25,1-60,8	1	81,5
Línea base	211,1	158,0-274,1		

^(a)CL50=concentración letal media; ^(b)LF=límites fiduciales (P<0,05); ^(c)FS-CL₅₀= Factor de susceptibilidad calculado a partir de la CL₅₀; ^(d) mortalidad (%) a la dosis de campo (120 mg L⁻¹).

Tabla 2. Toxicidad de emamectina benzoato para 8 poblaciones de *O. laevigatus*.

Población	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a	LF (95%) ^b	FS-CL ₅₀ ^c	Mortalidad DC (%) ^d
Policoro	10,2	2,6 -15,2	8,9	68,5
Hellín	3,9	1,6-7,1	3,4	83,0
Moreira	8,2	4,1-13,1	7,2	68,6
Cabo de Gata	3,9	0,6-7,1	3,4	86,6
Cuevas de Almanzora	32,8	14,6-46,7	28,8	12,2
Samaria	23,5	11,8-36,3	20,6	34,9
Acate	1,1	0,2-2,0	1	97,5
Portonovo	3,5	0,5-7,6	3,1	79,7
Línea base	6,4	4,5-8,6		

^(a)CL50=concentración letal media; ^(b)LF=límites fiduciales (P<0,05); ^(c)FS-CL₅₀= Factor de susceptibilidad calculado a partir de la CL₅₀; ^(d) mortalidad (%) a la dosis de campo (120 mg L⁻¹).

Cold-tolerance variability in different Mediterranean populations of Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

J. E. Mendoza, V. Balanza, M. Garre-Carrasco, P. Bielza

Departamento de Producción Vegetal, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, España. E-mail: enrique.menriv@gmail.com.

Resumen

La ausencia de diapausa en *Orius laevigatus* le permite controlar a *Frankliniella occidentalis* durante el invierno. Sin embargo, su potencial reproductivo se ve muy reducido con las bajas temperaturas, por lo que sería interesante obtener individuos capaces de multiplicarse de manera efectiva en esas condiciones. Se estudió la variabilidad de 14 poblaciones mediterráneas en su fecundidad a 15 °C, así como su tolerancia al frío, calculada como el porcentaje respecto de la fecundidad del control, a 26 °C. Además de probar que las poblaciones comerciales son optimizables, se hallaron diferencias significativas entre las poblaciones en cuanto a su fecundidad a bajas temperaturas. Por otro lado, al ponderar estos resultados con los obtenidos en el control, destaca Cartagena como una población de elevada tolerancia al frío, aunque su baja fecundidad la hace poco recomendable para su cría en biofábricas, mientras que Portonovo mostró una alta fecundidad en ambas condiciones de ensayo. Este estudio es el inicio de un proceso de selección con el fin de obtener una población tolerante al frío, lo que permitirá un control óptimo del trips en invierno, evitando sucesivas sueltas del insecto.

Palabras clave: antocóridos; fecundidad diaria media; trips; invierno.

Abstract

Diapause absence in *Orius laevigatus* enables it to control *Frankliniella occidentalis* over the winter. However, its reproductive potencial is reduced at low temperatures, so it would be interesting to obtain individuals with that effectively overgrow under those conditions. Thus, the variability in 14 Mediterranean populations was studied according to their fecundity when exposed at 15 °C, as well as their cold-tolerance, calculated as the percentage relative to the control fecundity, tested at 26 °C. Apart from showing that commercial stocks can be improved, significant differences were found between populations according to their low-temperature fecundity. On the other hand, when these results were weighted up, taking account those obtained in control, we could emphasize Cartagena as a high cold-tolerance population, but its low fecundity makes it inadvisable for the artificial rearing; whereas that collected in Portonovo showed a high fecundity under both experimental conditions. This study will serve as a basis for a selection to obtain a cold tolerant population, thus enabling an optimum control of thrips over the winter and avoiding successive insect releases.

Key words: anthocorids; average daily fecundity; thrips; winter.

1. Introducción

El uso de enemigos naturales para combatir a las plagas se está convirtiendo en una práctica cada vez más habitual. Entre los más usados, gracias a su eficiencia en numerosos agroecosistemas, se encuentra *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), depredador polífago y común en la cuenca Mediterránea y el norte de Europa [1].

En los últimos años, la atención sobre este insecto como agente de control biológico ha aumentado notablemente, sobre todo desde que empezara a considerarse como el principal enemigo de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), una de las plagas que mayores daños económicos provoca en cultivos de invernadero de todo el mundo [2,3], en los

que se establece este chinche y donde logra un éxito similar al control químico [4].

O. laevigatus, a diferencia de otras especies del género, no presenta diapausa reproductiva en invierno, lo que supone una ventaja tanto para su manejo en períodos climáticos desfavorables como para su efectividad en el control del trips, ya que tampoco éste sufre diapausa [5].

Sin embargo, ciertos factores como la humedad y la temperatura tienen una elevada influencia en la instalación de *O. laevigatus* en el cultivo [5], limitando, por ejemplo en el sur de España, los períodos del año en los que se aconseja la suelta del antocórido. Así pues, a estas latitudes es difícil encontrar *Orius* en invierno aunque se haya realizado una suelta efectiva durante el otoño, ya que el frío reduce drásticamente su fecundidad.

Las poblaciones de la plaga, por su parte, vuelven a proliferar durante esta época.

Es por eso que mejorar la fecundidad de *Orius* a bajas temperaturas aumentaría su eficacia en el control de la plaga, pudiendo incluso evitar las posteriores sueltas del insecto. En esa línea de trabajo, se estudió la variabilidad genética de *O. laevigatus* en el Mediterráneo en su tolerancia al frío, con el objeto de evaluar, más tarde, la respuesta a la selección de dicho carácter.

2. Materiales y Métodos

2.1 Recolección y cría de *Orius laevigatus*.

El material biológico usado se obtuvo de la cría artificial de *O. laevigatus* a partir de poblaciones silvestres recolectadas en distintas localidades de clima mediterráneo. El mantenimiento y la multiplicación se llevaron a cabo en recipientes de plástico en los que a los individuos se les administró un vial de agua sellado con algodón hidrófilo como fuente de hidratación, una judía como sustrato de puesta, huevos de *Ephestia kuehniella* como alimento y cáscara de trigo como refugio para evitar el canibalismo.

Las poblaciones objeto de estudio en el actual trabajo fueron Moreira, Portonovo (ambas de Pontevedra), Cabrils (Barcelona), Cabo de Gata, Cuevas de Almanzora (ambas de Almería), Cartagena (Murcia), La Zenia (Alicante), Hellín (Albacete), Ruidera (Ciudad Real), Carmona (Sevilla), Acate (Ragusa, Italia) y Samaria (Creta, Grecia), además de una población comercial y una población mezcla de todas las anteriores, con una mayor variabilidad genética.

2.2 Métodos de bioensayo.

Se partió de ninfas de último estadio de cada población, formando dos grupos de individuos que fueron introducidos en sendos recipientes con las mismas condiciones que en la cría pero con una diferencia fundamental en cuanto a la temperatura: mientras el control se mantuvo a 26 ± 1 °C, el tratamiento diferencial consistió en un enfriamiento rápido a 15 ± 1 °C, todo ello realizado mediante sendas cámaras de cultivo.

Tras un tiempo durante el cual emergen los adultos y se realiza la cópula, se individualiza a las hembras para estudiar la diferencia de fecundidad entre los dos tratamientos y entre las poblaciones. En pequeños recipientes de polipropileno de 45 mL con tapa ajustable se proporciona a cada hembra un trozo de judía como sustrato de puesta e hidratación, así como huevos de *Ephestia* como alimento. Mientras el

control se mantuvo a 26 °C de temperatura, el tratamiento diferencial continuó a 15 °C. Todos los bioensayos realizaron con fotoperiodo 16:8 (Luz: Oscuridad).

2.3 Lectura y toma de datos.

Cada 2-3 días se cambió la judía a las hembras aisladas, anotando el número de huevos puestos durante ese tiempo. Este proceso se repitió a lo largo de dos semanas.

2.3 Tratamiento estadístico.

Los bioensayos se realizaron completamente al azar, con dos tratamientos por cada población y un total de 10 a 20 réplicas por tratamiento ($n=10-20$). Mediante un test de correlación se evaluó la interacción entre los tratamientos, y mediante una prueba t-Student se estudió la diferencia de medias entre ambos.

Transformadas las medias de tolerancia al frío y confirmados los criterios de normalidad y homocedasticidad tanto para éstas como para las medias de fecundidad en los tratamientos, se realizó un ANOVA para cada parámetro en función de la población. Cuando se observaron diferencias significativas entre las poblaciones, se separaron sus medias mediante un test de comparaciones múltiples. Todos los test se evaluaron al 95% de confianza ($p < 0,05$) [6-7].

3. Resultados y Discusión

El análisis de correlación constató que no existe relación alguna entre la fecundidad diaria media (FDM) de los tratamientos ensayados ($F=2,085$; g.l.=1; $r=0,010$; $P=0,150$).

En primer lugar, hay que destacar que todas las poblaciones de *O. laevigatus* pusieron huevos independientemente de la temperatura, gracias a que esta especie presenta cierta capacidad de adaptación al frío por la ausencia en ella de diapausa reproductiva durante el invierno. Además, Lara et al. [8] ya observaron en Almería una presencia mayor de *O. laevigatus* que de *O. albidipennis* en tres invernaderos durante todo el invierno de 2001. En cambio, Nagai y Yano [9] notaron que el 50% de las hembras de *O. sauteri* morían a 15 °C sin poner huevos.

Sin embargo, en la Tabla 1 podemos ver cómo la FDM desciende claramente al someter a todas las poblaciones de *O. laevigatus* a 15 °C ($t=27,267$; g.l.=205; $P=0,000$). De hecho, el valor medio de FDM fue de 6,56 huevos por hembra y día en el control, frente a los 1,19 huevos a 15 °C, lo que supone una reducción del 82%. Este efecto del

frío se ha documentado para muchas especies de *Orius*. Así, Jeong-Hwan et al. [10] observaron una disminución de un 55% en la fecundidad de *O. laevigatus* y un 77% en la de *O. strigicollis* al bajar la temperatura de 25 a 15 °C; además, Nagal y Yano [9] advirtieron una reducción del 91,7% en la fecundidad de *O. sauteri* a esas mismas temperaturas de ensayo.

Por otro lado, en la Tabla 1 también se muestran los resultados para las tres variables evaluadas en función de la población: FDM en el control, FDM a 15 °C y tolerancia al frío.

En primer lugar, aunque se observan diferencias entre las distintas poblaciones en cuanto a su FDM en el control ($F=6,983$; $g.l.=13$; $P=0,000$), éstas pueden considerarse dentro del rango de variabilidad natural de la especie. A pesar de ello, se distinguen dos poblaciones con una elevada FDM, Portonovo y Hellín, así como otra con una baja FDM, Cabo de Gata, existiendo una diferencia de casi 6 huevos por hembra y día entre ellas. Además, parece evidente que las poblaciones comerciales son susceptibles de ser optimizadas, ya que se han hallado algunas con una fecundidad más alta en condiciones óptimas que la población comercial ensayada, teniendo en cuenta que la alimentación ha tenido lugar *ad libitum*, al igual que ocurre en las biofábricas.

Por otro lado, en el tratamiento a 15 °C también se obtuvieron diferencias significativas entre las poblaciones ($F=4,081$; $g.l.=13$; $P=0,000$), con una FDM muy baja para Samaria ($0,91\pm 0,34$), La Zenia ($0,83\pm 0,41$) y Cabo de Gata ($0,72\pm 0,33$); y relativamente alta para Cartagena ($1,80\pm 0,74$).

Finalmente, en cuanto a la tolerancia al frío, calculada aquí como el porcentaje de la FDM a 15 °C respecto de la registrada en el control, también se observaron diferencias entre las poblaciones tratadas ($F=7,598$; $g.l.=13$; $P=0,000$). Destaca, entre ellas, Cartagena por su elevada tolerancia al frío, ya que su FDM supera el 40% de la FDM en el control. Además, ésta fue la población menos fecunda en el control, lo que podría deberse al coste ecológico provocado por un posible proceso de adaptación para hacer frente a una situación adversa. En el otro extremo se encuentran Hellín, Samaria y Acate, en las que la FDM en el tratamiento diferencial fue inferior al 19% respecto del control. Estos resultados son similares a los obtenidos por este mismo grupo de trabajo [11] cuando se estudió la variabilidad en la tolerancia a alimentación con polen respecto de un control alimentado con huevos de *Ephestia*, y en el que las poblaciones más tolerantes fueron las de menor fecundidad

en condiciones óptimas. Además, en aquel caso, la población de Portonovo mostró una tolerancia similar a la registrada en este ensayo (19% de tolerancia a la alimentación sin presa respecto al 19,3% de tolerancia al frío), lo cual puede estar relacionado con su capacidad para afrontar cualquier situación de estrés.

En cuanto a las poblaciones aquí estudiadas, es interesante señalar que la que mejor beneficio ofrecería para la cría masiva en biofábricas no es la población de Cartagena sino la recolectada en Portonovo, la cual posee una fecundidad alta en frío y también a una temperatura de desarrollo óptimo, ofreciendo un rendimiento inmediato.

4. Conclusiones

Las observaciones realizadas en este estudio revelan que la supervivencia y la reproducción de *O. laevigatus* dependen en gran medida de la temperatura, aspecto que resulta fundamental a la hora del manejo en campo de este insecto, ya que cualquier mejora que tuviese lugar en su tolerancia al frío permitiría aumentar su eficacia en el control de la plaga durante el invierno, al conservar un efectivo poblacional más alto.

No obstante, la extrapolación al campo de los resultados aquí expuestos debe hacerse con precaución, ya que el potencial reproductivo de *Orius* en condiciones de laboratorio puede ser muy distinto al que presente en el invernadero.

En cualquier caso, este trabajo servirá de base para el estudio de la respuesta a la selección de la tolerancia al frío en *O. laevigatus*, cuyo éxito implicará un mejor establecimiento en el cultivo, poblaciones de enemigos naturales más estables a medio y largo plazo desde su suelta en el invernadero, y un control más óptimo de las poblaciones de trips durante el invierno, el cual lleva muchos años siendo el talón de Aquiles del manejo de esta plaga en muchos cultivos.

5. Agradecimientos

Los autores se muestran agradecidos a M. J. Sánchez-Martínez y E. Martínez-Díaz por su inestimable ayuda técnica.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Péricart, J. 1972. Hémiptères. Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest-Paléartique. Masson et Cie. Paris. 402 pp.
- [2] van den Meiracker, R. A. F., Ramakers, P. M. J. 1991. Biological control of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* in sweet pepper,

with the anthocorid predator *Orius insidiosus*. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 56 (2a): 241-249.

[3] Urbaneja, A., Arán, E., León, P., Gallego, A. 2003. Efecto combinado de altas temperaturas y de humedades en la supervivencia, fecundidad y fertilidad de *Orius laevigatus* y *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae). Bol. San. Veg. Plagas 29: 27-34.

[4] Vergara, L., Giacometti, R., Cupo, P. 2009. Integrated control in peppers: functional and advisable. Informatore Agrario 65(20), 53-58.

[5] Tommassini, M. G. y van Lenteren, J. C. 2003. Occurrence of diapause in *Orius laevigatus*. Bull. of Insect. 56: 225-251.

[6] Statacorp, 2005. Stata statistical Software/ Release 9. StataCorp LP.

[7] Spss Inc., 2006. Guide to data analysis, version 15.0. Spss Inc.

[8] Lara, L., Blom, J. v. d. Urbaneja, A. 2002. Instalación, distribución y eficacia de *Orius laevigatus* (Fieber) y *Orius albidipennis* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) en invernaderos de

pimiento en Almería. Bol. San. Veg. Plagas 28: 251-261.

[9] Nagai, K. y Yano, E. 1999. Effects of temperature on the development and reproduction of *Orius sauteri* (Poppius) (Heteroptera: Anthocoridae), a predator of *Thrips palmi* (Karny) (Thysanoptera: Thripidae). Appl. Entomol. Zool. 34 (2): 223-229.

[10] Jeong-Hwan, K., Hwang-Yong, K., Young-Woong, B. y Yong-Heon, K. 2008. Biological characteristics of two natural enemies of thrips, *Orius strigicollis* (Poppius) and *O. laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). Korean J. Appl. Entomol. 47 (4): 421-428.

[11] Mendoza, J. E., Balanza, V., Sánchez-Martínez, M. J., Bielza, P. 2014. Variabilidad de la tolerancia a la alimentación sin presa en distintas poblaciones mediterráneas de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). En: Actas del III Workshop en Investigación Agroalimentaria. Ed.: Universidad Politécnica de Cartagena. ISBN: 978-84-697-1358-7. 155-158.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Diferencias en la Fecundidad Diaria Media de las distintas poblaciones de *Orius laevigatus* ensayadas en función de la temperatura. Diferencias en la tolerancia al frío (ANOVA).

Población	n ^a	FDM control ^b	FDM frío ^b	Tolerancia (%) ^c
Hellín	18	8,55 ± 2,00 d	1,07 ± 0,52 abc	12,49 ± 6,07 a
Samaria	16	6,98 ± 2,16 bcd	0,91 ± 0,34 a	13,00 ± 4,89 a
Acate	11	7,60 ± 1,90 cd	1,06 ± 0,55 ab	13,90 ± 7,28 a
La Zenia	14	5,46 ± 3,32 abc	0,83 ± 0,41 a	15,26 ± 7,42 ab
Cuevas de Almanzora	19	7,23 ± 2,67 bcd	1,18 ± 0,59 abc	16,27 ± 8,13 ab
Comercial	17	7,64 ± 1,74 cd	1,26 ± 0,57 abc	16,51 ± 7,51 ab
Mezcla	16	6,22 ± 1,88 bcd	1,04 ± 0,47 ab	16,65 ± 7,55 ab
Cabrils	15	7,44 ± 3,42 bcd	1,34 ± 0,56 abc	17,98 ± 7,49 ab
Carmona	12	6,44 ± 2,25 bcd	1,17 ± 0,52 abc	18,21 ± 8,01 ab
Portonovo	14	9,11 ± 2,64 d	1,76 ± 0,88 bc	19,26 ± 9,60 ab
Moreira	11	6,24 ± 3,09 bcd	1,27 ± 0,86 abc	20,30 ± 13,87 ab
Cabo de Gata	12	3,16 ± 1,20 a	0,72 ± 0,33 a	22,76 ± 10,55 abc
Ruidera	14	4,42 ± 2,29 ab	1,19 ± 0,50 abc	26,93 ± 11,42 bc
Cartagena	17	4,43 ± 1,84 ab	1,80 ± 0,74 c	40,55 ± 16,67 c

Las medias ± SE de cada columna seguidas por la misma letra no son significativamente distintas, $p > 0,05$, Test de Tukey.

^a n: número de hembras ensayadas para cada tratamiento, una vez corregidos los valores perdidos.

^b FDM: Fecundidad Diaria Media, expresada en número de huevos puestos por cada hembra al día.

^c Tolerancia al frío (%) = $FDM \text{ frío } (15 \text{ }^\circ\text{C}) \cdot 100 / FDM \text{ control } (26 \text{ }^\circ\text{C})$.

Agronomic effects of three cultivation techniques (conventional, integrated and organic) on yield of sweet pepper under greenhouse cultivation.

J. Navarro Sánchez⁽¹⁾, F. M. del Amor Saavedra⁽²⁾, J. Cánovas Cuenca⁽²⁾

⁽¹⁾ Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, Plaza Juan XXIII s/n, 30008. Murcia. España. E-mail: joanquin.navarro@carm.es

⁽²⁾ Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, C/ Mayor, s/n, 30150. La Alberca (Murcia). España.

Resumen

El cultivo del pimiento en el Campo de Cartagena tiene una estructura eminentemente familiar, con gran número de pequeños productores y elevados requerimientos de mano de obra. Con el objetivo de conocer el comportamiento productivo de tres técnicas de cultivo (ecológico, integrado y convencional), se diseñó un experimento en el año 2005, bajo un invernadero de 640 m² en el que se ensayó una plantación de pimiento híbrido tipo "Lamuyo", var. 'Almuden', utilizando ocho lisímetros y aplicando unas mismas dosis de riego y labores culturales. Se ensayaron distintos aportes de abonado mineral, que se han denominado T-E (tratamiento ecológico), T-I (tratamiento integrado) y T-C (tratamiento convencional). Los resultados obtenidos confirmaron que la producción total acumulada en el cultivo integrado (T-I), dónde llegó a los 11,37 kg/m² y 62,05 frutos/m², fue significativamente superior a los otros dos tratamientos estudiados. Entre T-E y T-C no se observó diferencias significativas, obteniéndose 8,80 kg/m² y 52,21 frutos/m² en T-E y 9,29 kg/m² y 48,64 frutos/m² en T-C. El T-I fue el que obtuvo mejores resultados en rendimiento, número de frutos y mayores calibres. Se concluye que una única aplicación de estiércol, ayudada con aportes moderados de abono mineral optimiza la producción de este cultivo.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L.; agricultura ecológica; optimización de nutrientes, estrategias de fertilización.

Abstract

Cultivation of sweet pepper in Campo de Cartagena has a family structure, with many small producers and high labor requirements. In order to investigate yield response of three cultivation techniques (organic, integrated and conventional), an experiment was designed in 2005 in a greenhouse of 640 m² in which sweet pepper "Lamuyo" type var. 'Almuden' was studied. The same irrigation dosage was applied in each cultural practice, which was monitored in eight lysimeters. Different contributions of mineral fertilizer, which have been called TE (organic treatment), TI (integrated treatment) and TC (conventional treatment), were tested. The results confirm that the total accumulated yield in the integrated treatment (TI), (11.37 kg/m² and 62.05 fruits/m²) was significantly higher than the other two treatments studied. No significant differences between TE and TC were observed (TE: 8.80 kg/m² and 52.21 fruits/m²; TC: 9.29 kg/m² and 48.64 fruits/m²). TI treatment was the best cultivation technique as produced higher yield, number of fruits and larger sizes. We conclude that a single application of manure with a moderate supply of mineral fertilizer can optimize the yield of this crop.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; Organic production; nutrient optimization; fertilization strategies.

1. Introducción

El cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L., fam. Solanaceae) tiene gran importancia en la Región de Murcia, dónde su superficie total se aproxima a las 1800 ha, dando lugar a una producción comercializable de unas 155000 t. El número de productores de pimiento es de 1455, cultivando una superficie media de 1,24 ha, lo que indica que la estructura de producción de las

explotaciones es familiar, por lo que es un cultivo eminentemente social [1].

La contaminación por nitratos es un efecto atribuido a la actividad agraria que es objeto de acciones preventivas y correctoras emanadas de la política medioambiental de la Unión Europea: la Directiva 91/676/CEE, del Consejo, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por

nitratos utilizados en agricultura. Desde la perspectiva de protección medioambiental, las dosis de abonado han de ser suficientes para que los cultivos produzcan, al menos normalmente, y que su efecto sobre los recursos naturales, especialmente el agua, sea mínimo para que la actividad se considere sostenible [9].

Considerando estas cuestiones se planteó en 2004 la realización del Proyecto de Investigación "Contaminación por fertilizantes y fitosanitarios en un cultivo de pimiento de invernadero para tres métodos de producción. Influencia sobre el rendimiento, la calidad de los frutos y su conservación", que ha sido financiado por el I.N.I.A. (Proyecto RTA04-035). Los ensayos debían aportar información básica para conocer la repercusión (en la producción de los frutos) que tienen las técnicas de cultivo de T-E, T-I y T-C (cultivo ecológico, integrado y convencional), y evaluar el efecto de la aplicación de distintas dosis de fertilizantes nitrogenados de uso común.

2. Materiales y Métodos

La infraestructura fundamental del ensayo es un conjunto de ocho lisímetros de drenaje de 7,80 x 6,65 m² cada uno, cuya profundidad varía entre 0,7 m. en la parte del lateral del invernadero y 0,8 m. junto a la zanja central. Se ubicaron bajo invernadero tipo capilla sin calefacción de dimensiones 32 x 20 m², orientación Noroeste-Sureste, con ventilación cenital, humidificación y riego por goteo. El invernadero estaba recubierto de PE de 800 galgas de espesor, situado en la finca del C.I.F.E.A. de Torre-Pacheco, en el Campo de Cartagena.

2.1. Diseño experimental.

El diseño experimental consistió en ensayar tres técnicas distintas de cultivo para comparar su efecto en la producción de pimientos, manteniendo iguales las labores culturales en todos los lisímetros, realizando los siguientes tratamientos experimentales, distribuidos en bloques al azar :

a) Tratamiento ecológico (T-E); la fertilización de estas parcelas se realizó antes de la plantación con la aplicación de estiércol de oveja bien fermentado, a razón 4 kg/m². Se practicó exclusivamente lucha biológica para el control fitosanitario del cultivo.

b) Tratamiento integrado (T-I); el mismo estercolado que el T-E y aportes de abonos minerales empleando unas dosis inferiores a las máximas establecidas en las Normas Técnicas recomendadas en la Región de Murcia para la Producción Integrada. Se realizó lucha biológica

combinada con lucha química para el control fitosanitario del cultivo.

c) Tratamiento convencional (T-C); el mismo estercolado que el T-E y aportes de abonado mineral a dosis que eran del doble de las aplicadas en T-I, dando como resultado aportes que son muy parecidos a los que tradicionalmente usan los agricultores de la zona. Se realizó exclusivamente lucha química para el control fitosanitario del cultivo.

El 14 de Diciembre de 2005 se trasplantaron los pimientos híbridos tipo "Lamuyo", var. 'Almuden' a un marco de 1 x 0,4 m², concluyendo el ensayo el 21 de agosto de 2006 con el levantamiento del cultivo. Previamente se había realizado solarización del terreno. La programación del riego se realizó calculando una dosis semanal, mediante la fórmula recomendada por la FAO [5]. La frecuencia del riego se determinó mediante el uso de tensiómetros situados en cada lisímetro a tres profundidades: 20, 40 y 60 cm. Resultó de la programación del riego una media de un aporte cada 3,2 días y 220 m³/ha a la semana, con unas necesidades hídricas totales del cultivo de 7370 m³/ha.

El control del abonado se realizó pesando las dosis previamente establecidas y aplicándolas por medio de abonadora individual para cada parcela elemental del ensayo. Los abonos empleados fueron: ácido fosfórico, nitrato cálcico, nitrato potásico y sulfato de magnesio. Se realizó todo el abonado a través de la red de goteo, mediante abonadoras individuales para cada parcela elemental y con una frecuencia semanal para cada tipo de abono (N, P, K). En la Tabla 1, se representa el abonado mineral que se ha aplicado para cada uno de los tratamientos, expresado en g/m², al que hay que añadir 4 kg/m² de estiércol fermentado.

3. Resultados y Discusión

Se realizaron un total de siete recolecciones comprendidas entre los meses de mayo y agosto de 2006, cuando los frutos alcanzaban la madurez, recolectando los frutos a mano cuando estaban con la dureza y tonalidad característica de la variedad y colocándolos en cajas de plástico de 15 Kg. La Tabla 2 indica las categorías de pimiento establecidas.

La producción comerciable, sin distinguir categorías, fue muy superior en el T-I con 11,37 kg/m² frente a la producción de T-E y T-C que durante todo el ciclo se han comportado de una forma similar, dando un rendimiento de 8,80 kg/m² y 9,29 kg/m² respectivamente. Las

diferencias productivas del T-I son altamente significativas con respecto a los otros dos tratamientos que no difieren entre si.

Una de las componentes del rendimiento más importantes, que también es objeto de estudio, es el número de pimientos por metro cuadrado. El número de pimientos comercializable total acumulado, sin distinguir categorías, es mayor en el T-I (62,05 pimientos/m²), que difiere del T-C (48,64 pimientos/m²), pero no del T-E (52,21 pimientos/m²).

Porcentualmente el *Cultivo Convencional* es el que produce más frutos de Categoría Extra y I, y menos de las Categorías II, III e Industria. El *Cultivo Ecológico* es el tratamiento que produce menor porcentaje de destrío y de pimientos de Categoría Extra y I, y un mayor porcentaje de frutos de Categoría II, III e Industria, aunque la mayor producción total comercializable la tiene el *Cultivo Integrado* (Tabla 5).

Podemos concluir que el ensayo de tres técnicas de cultivo, en pimiento híbrido tipo Lamuyo, se ha traducido por diferencias significativas en cuanto a la cantidad y calibre de la cosecha.

Respecto al rendimiento comercial del cultivo, la producción total es muy superior en T-I (11,37 kg/m²) que en T-C (9,29 kg/m²) y T-E (8,80 kg/m²); coincidiendo esta tendencia también para los frutos de Categoría Extra y I, donde la producción total en T-I ha sido de 8,79 kg/m². De esto se puede inferir que al ser el aporte de fertilizantes (orgánicos e inorgánicos) más paulatino que la aportación única e inicial de estiércol en el tratamiento ecológico y a dosis inferiores que en el convencional, se consigue un mejor aprovechamiento, minimizando las pérdidas, y obteniendo unos mejores resultados en la producción, tanto en la cantidad como en el calibre.

4. Conclusiones

Podemos afirmar que una menor producción en los tratamientos ecológico y convencional, frente al tratamiento integrado, se debió principalmente a las diferencias en el abonado mineral y más concretamente en el abonado mineral nitrogenado. En el caso del T-E se explica también la menor producción por la incidencia de plagas y enfermedades sobre el cultivo, mientras en T-C y T-I, el control de estas mismas patologías si fue eficaz. A esto también se podría sumar el hecho de que en los tratamientos en los que no se reponía el N extraído del suelo durante el cultivo, provoca a largo plazo, una disminución de las reservas de N de la planta reduciendo la fotosíntesis y por tanto la producción. Sin

embargo, se ha demostrado que concentraciones de N elevadas permiten un mayor crecimiento y cuajado de los frutos cuando los ciclos de cultivo de pimiento son más largos [10].

Al principio el peso fresco unitario fue mayor en T-E, y menor en T-C, hasta los 196 días después del trasplante, donde empieza a notarse la merma productiva de T-E con respecto a los otros dos tratamientos. De la misma manera el número de frutos producidos por m², tanto totales como de Categoría Extra y I, también fue mayor en T-I frente al resto de los otros tratamientos a partir de la 3^a recolección.

La aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados, que favorece el crecimiento vegetativo y viene acompañada de una menor producción, es considerada como sobre-fertilización [8] y fue la causante de la disminución del rendimiento en las plantas con tratamiento T-C. Resultados similares han sido descritos por otros autores [2 y 4]. Según Marschner (1995) [7], el efecto que produce una excesiva fertilización nitrogenada sobre los niveles de fitohormonas en planta y por tanto sobre el desarrollo de la misma, puede ser la causa de la reducción de la producción.

Un aporte óptimo de N es esencial para el desarrollo de las plantas y para la productividad y longevidad de los cultivos hortícolas [3 y 6], lo que explica los mejores resultados del tratamiento integrado. Todo ello indica que un estercolado acompañado de aportes moderados de N, constituiría una fertilización óptima que aseguraría la producción y longevidad del cultivo de pimiento.

5. Agradecimientos

El presente proyecto ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria dentro del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agrarias en Cooperación con la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Se agradece la cesión del invernadero para los ensayos al C.I.F.E.A. de Torre-Pacheco.

6. Referencias bibliográficas

- [1] AMOPA. 2010. Estudio general de la estructura y balance agronómico y económico de las explotaciones agrícolas de la Región de Murcia.
- [2] Aliyu L. 2000. Effect of organic and mineral fertilizers on growth, yield and composition of pepper (*Capsicum annum* L.). *Biol. Agric. Hortic.* 18, 29-36

- [3] Aloni B., Pashkar T., Karni L., Daie J. 1991. Nitrogen supply influences carbohydrate partitioning of pepper seedlings and transplant development. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116, 995-999
- [4] Baghour M., Ruiz J.M., Romero L., 2000. Metabolism and efficiency in nitrogen utilization during senescence in pepper plants: Response to nitrogenous fertilization. *J. Plant Nutr.* 23, 91-101
- [5] Doorenbos, Pruitt. 1977. Las necesidades de agua de los cultivos. Estudio FAO. Riego y Drenaje nº 24. Roma.
- [6] Huett D.O. 1996. Prospects for manipulating the vegetative reproductive balance in horticultural crops through nitrogen nutrition: A review. *Aust. J. Agr. Res.* 47, 47-66
- [7] Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. New York. 6-78
- [8] Weinbaum S.A., Johnson R.S., Dejong T.M., 1992. Causes and consequences of overfertilisation in orchards. *Hort. Technology.* 2, 112-120
- [9] Winsor G., Adams P. 1987. Diagnosis of mineral disorders in plants. Volume Glasshouse Crops. Ministry of Agriculture and Food. United Kingdom.
- [10] Xu G.H., Wolf S., Kafkafi U. 2001. Effect of varying nitrogen form and concentration during growing season on sweet pepper flowering and fruit yield. *J. Plant Nutr.* 24, 1099-1116

Tablas y Figuras

Tabla 1. Abonado mineral aplicado para cada tratamiento.

Año/Tto	N g/m ²	P ₂ O ₅ g/m ²	K ₂ O g/m ²	CaO g/m ²	Mg O g/m ²	S g/m ²
T-E	0	0	0	0	0	0
2005 T-I	14,4	9,0	27,0	11,3	5,2	10,1
T-C	28,7	18,0	54,0	22,6	10,4	20,3

Tabla 2. Categorías de pimiento establecidas en la recolección.

Extra	1ª Categ.	2ª Categ.	3ª Categ.	Industria	Destrio
> 210g	209-150 g	149-110 g	109-85 g	< 85 g	Frutos dañados por plagas, enfermedades o deformaciones

Tabla 3. Reparto porcentual de la producción total en los tres tratamientos.

TRAT.	EXTRA y I (%)	II y III (%)	INDUSTRIA (%)	DESTRIO (%)	TOTAL (g/m ²)
T-E	67,87 a	21,12 a	9,19 a	1,82 a	8959,49 a
T-I	74,67 c	15,47 a	6,51 a	3,36 b	11769,94 b
T-C	78,84 b	13,62 b	4,46 b	3,08 ab	9587,62 a

Test de Tukey, T-E: cultivo ecológico; T-I: cultivo integrado; T-C: cultivo convencional.

Study of the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to two diamides

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

Protección de Cultivos. Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. 30203 Cartagena. charo_martinez_aguirre@hotmail.com

Resumen

Helicoverpa armigera es una plaga muy polífaga que produce graves problemas en una amplia gama de cultivos. Sus larvas se alimentan de hojas, brotes, tallos, flores y frutos. La vía más común para evitar pérdidas de cosecha es el uso de insecticidas. En este trabajo se ha estudiado la susceptibilidad de este lepidóptero a cyazypyr y rynaxypyr para dos estadios larvarios diferentes (L1 y L3). Existe un rango de susceptibilidad a cyazypyr de 0,048 – 0,241 ppm, lo que supone una variabilidad natural de 5x. En el caso de rynaxypyr el rango comprende desde 0,027 a 0,191 ppm, con una variabilidad de 7x. Ambos valores de variabilidad pueden considerarse normales para estos productos. La susceptibilidad de las poblaciones no se ha visto afectada por la procedencia de las mismas ni por el estadio estudiado, como se observa para la población RT en L1 y L3, para ambos productos.

Palabras clave: resistencia; cyazypyr; rynaxypyr; clorantraniliprol; cyantraniliprol

Abstract

Helicoverpa armigera is a polyphagous pest that causes serious problems in a wide range of crops. The larvae feed on leaves, buds, stems, flowers and fruits. The most common way to avoid crop losses is to use insecticides. In this work we studied the susceptibility of this pest to cyazypyr and rynaxypyr at two different larval stages (L1 and L3). The interval of susceptibility to cyazypyr was from 0.048 to 0.241 ppm with a natural variability of 5-fold. The range for rynaxypyr was 0.027 - 0.191 ppm showing a natural variability of 7-fold. Both values of variability can be considered normal for these products. The susceptibility of populations was not affected by the origin or the life-stage studied as we observed for the RT population for L1 and L3, for both products.

Keywords: resistance; cyazypyr; rynaxypyr; clorantraniliprole; cyantraniliprole

1. Introducción

Helicoverpa armigera (Hübner, 1805) (Fig.1) conocida como oruga del tomate pertenece a la familia *Noctuidae* (orden *Lepidoptera*). Está extendida por todo el mundo y sus larvas prefieren alimentarse de órganos reproductores como cápsulas, frutos, flores o mazorcas [1].

H. armigera es una plaga polífaga y en el cultivo del tomate es en el que causa más daños [2]. Penetra en el fruto del tomate para alimentarse y para trasladarse de un fruto a otro, multiplicando así los daños. En el cultivo del algodón, esta especie perfora y destruye el interior de las cápsulas, provocando los mismos daños en los botones florales de algunas ornamentales como son el rosal y el clavel. La alimentación de las larvas conlleva un daño indirecto, la aparición de hongos provocados por la destrucción ocasionada en los tejidos en la alimentación [1] así como las heces que deposita en el interior [2].

Entre otros se pueden encontrar las siguientes plantas hospedantes: cebolla, girasol, pepino, rábano, calabaza, calabacín, garbanzo, críticos, zanahoria, judías, guisante, avena [3].

Este elevado potencial de daños provoca el uso de insecticidas de amplio espectro, siendo ésta la vía más común por parte de los agricultores para evitar pérdidas de cosecha [4].

Los objetivos de este trabajo consisten en determinar la susceptibilidad de varias poblaciones de la plaga objeto de estudio, a dos diamidas, y estudiar si hay diferencias en la susceptibilidad en función del estadio larvario.

Los insecticidas utilizados son Altacor® (clorantraniliprol 35%) comúnmente conocido como rynaxypyr y Benevia® (cyantraniliprol 10%) comúnmente conocido como cyazypyr. Ambos pertenecen a DuPont y se encuentran en el grupo 28 de la clasificación de IRAC (Comité de Acción Contra Resistencia a Insecticidas) [5].

2. Materiales y Métodos

El origen, nombre y año de recepción de las poblaciones estudiadas se puede observar en la Tabla 1.

Los bioensayos se llevaron a cabo con larvas de primer (L1) y tercer estadio (L3). Ambos

bioensayos se realizaron siguiendo la misma metodología, solo varió la edad de las larvas.

Estos bioensayos se realizaron con dieta artificial siguiendo el método número 11 (versión 1) de IRAC.

En primer lugar se prepararon las diferentes concentraciones del insecticida más un control, se añadió la dieta y se llevó a cabo la homogeneización manualmente (Fig.2)

A continuación, se introdujo la dieta en unas celdas que poseen unas bandejas plásticas especiales. Se rellenaron tantas celdas como repeticiones y concentraciones se quisieron estudiar. Se puso una larva por celda (del estadio deseado) y se taparon con su correspondiente tapadera transpirable para evitar condensación, escape de la larva y dejar pasar la luz (Fig.3)

El bioensayo se mantuvo a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo 16:8 h durante 7 días. Transcurrido ese tiempo se procedió a la lectura del bioensayo, distinguiendo entre larvas vivas, muertas y moribundas. A la hora de trabajar con los datos, las larvas moribundas se consideraron muertas (Fig.4)

Los datos se analizaron mediante método probit con ayuda del programa Polo Plus.

3. Resultados y Discusión

La susceptibilidad de *H. armigera* a cyazypyr no sigue un patrón según la procedencia de la población. Como se puede observar en la Tabla 2, la población más sensible es de Navarra (Pamplona) con una concentración letal 50 (CL50, concentración la cual se muere el 50% de la población) de 0,048 ppm y la menos susceptible de Málaga (Boquerón) con una CL50 de 0,241 ppm, siendo esta última 5 veces más resistente que Pamplona (FS). Este valor de 5 se puede considerar un valor normal incluso bajo dentro de la variabilidad natural entre poblaciones, a pesar de haber pequeñas diferencias significativas entre poblaciones.

Para rynazypyr sucede lo mismo respecto a la localización (Tabla 3). En este caso la más resistente procede de Francia (Fontaine) con una CL50 de 0,191 ppm, al igual que la segunda menos susceptible (Le Thor) con una CL50 de 0,096 ppm, siendo la más sensible de España (Almería) con una CL50 de 0,027 ppm. En este caso la variabilidad natural es de 7, que aún siendo un valor mayor que el anterior se sigue encontrando dentro de la variabilidad natural,

dentro de lo esperado. No se puede concluir que exista una resistencia como tal en ninguna población. Para este producto también se encuentran pequeñas diferencias significativas entre poblaciones.

Datos similares se encuentran descritos para *Spodoptera exigua* en 18 poblaciones de campo de China, cuya CL50 a clorantropil se encuentra entre 0,039 – 0,240 ppm, siendo su FS de 6,2 [6]. Para este mismo producto sucede lo mismo con *Plutella xylostella*. La CL50 varía entre 0,015 – 0,056 ppm de 3 poblaciones de laboratorio y 12 de diferentes regiones de Brasil (poblaciones de campo) [7].

Respecto a la susceptibilidad en función del estadio larvario estudiado, como se observa en la Tabla 4 para cyazypyr y en la Tabla 5 para rynazypyr, no se encuentran diferencias significativas para los diferentes estadios, bioensayada la misma población (RT) para L1 y L3.

4. Conclusiones

El factor procedencia de las diferentes poblaciones no ha sido determinante para la susceptibilidad de las mismas para ambos productos. La variabilidad natural de 5 para cyzypyr y de 7 para rynazypyr, se pueden considerar normales dentro de la variabilidad natural de las poblaciones.

Así mismo, la susceptibilidad no se ha visto afectada al estudiar larvas de diferente estadio para una misma población, en este caso L1 y L3 para RT.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

[1] López Rodríguez, M., García Bernal, J.P., Navas Becerra, J.A., Ortíz Berrocal, F., Contreras, J.L., Justicia del Río, L. y Fernández Fernández, M. 2000. Cultivos hortícolas II. Plagas y enfermedades. Conserjería de Agricultura y Pesca. Conserjería de Trabajo e Industria. Conserjería de Salud. Pag.: 46, 49.

[2] Jordá Gutiérrez, C., Arias Delgado, M., Tello Marquina, J., Lacasa Plasencia, A. y Del Moral de la Vega, J. 1998. La sanidad del cultivo del tomate. Fisiopatías, plagas, enfermedades, malas

hierbas y su relación en el agrosistema. Phytoma. Pag.: 87, 89.

[3] Cabello García, T., González Mármol, M., Justicia del Río, L. y Belda Suárez, J.E. 1996. Plagas de noctuidos (Lep.; Noctuidae) y su fenología en cultivos en invernaderos. Informaciones técnicas 39/96. Pag.: 35.

[4] Izquierdo, J.I., Solans, P. and Vitalle, J. 1994. Parasitoides y depredadores de *Helicoverpa armigera* (Hübner) en cultivos de tomate para consumo en fresco Bol. San. Veg. Plagas, 20: 521-530.

[5] <http://www.irac-online.org/content/uploads/DIAMIDAS-GRUPO28-Poster-jun11.pdf>

[6] Lai, T., Li, J. y Su, J. 2011. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. Pesticide Biochemistry and Physiology 101: 198 - 205.

[7] Da Silva, J.E., De Siqueira, H.A.A., Silva, T.B.M., De Campos, M.R. y Barros, R. 2012. Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. Crop Protection 35: 97-101.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Origen, nombre y año de recepción de las poblaciones estudiadas

País de origen	Procedencia	Nombre de la población	Año de recepción
España	Navarra	Pamplona	2011
		Boquerón	2011
	Málaga		
	Almería	Almería	2013
Francia	Murcia	Alhama	2013
	Francia	Francia	2011
	Francia	Le Thor	2013
	Francia	Fontaine	2013
	Francia	RT	2014

Tabla 2. CL50 de las diferentes poblaciones estudiadas, factor de susceptibilidad y número de individuos bioensayados para cyazypyr.

	CL50 (ppm)	FL95%	FS	N
Boquerón	0,241	0,174-0,506	5,02	287
Le Thor	0,225	0,152-0,498	4,69	239
Fontaine	0,114	0,088-0,152	2,38	389
Almería	0,104	0,070-0,153	2,17	213

Francia	0,073	0,059-0,094	1,52	608
Alhama	0,059	0,032-0,091	1,23	239
Pamplona	0,048	0,040-0,056	-	288

CL50 (ppm): concentración letal 50 en partes por millón. FL95%: límites fiduciales al 95%.

FS: factor de susceptibilidad.

N: número de individuos analizados.

Tabla 3. CL50 de las diferentes poblaciones estudiadas, factor de susceptibilidad y número de individuos bioensayados para rynaxypyr.

	CL50 (ppm)	FL95%	FS	N
Fontaine	0,191	0,087-0,499	7,07	230
Le Thor	0,096	0,056-0,149	3,56	118
Alhama	0,036	0,022-0,057	1,33	241
Francia	0,028	0,023-0,037	1,06	288
Almería	0,027	0,009-0,052	-	209

Tabla 4. CL50 y número de individuos bioensayados para larvas L1 y L3 de la misma población para cyazypyr.

	Estadío	CL50 (ppm)	FL95%	N
RT	L3	0,029	0,024-0,036	324
	L1	0,034	0,027-0,042	450

Tabla 5. CL50 y número de individuos bioensayados para larvas L1 y L3 de la misma población para rynaxypyr.

	Estadío	CL50 (ppm)	FL95%	N
RT	L3	0,008	0,006-0,010	353
	L1	0,015	0,010-0,02	354

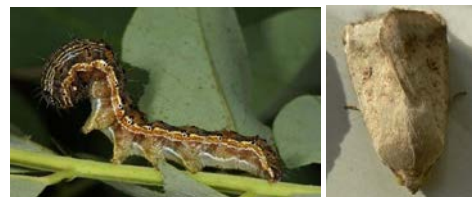


Figura 1. Foto de la izquierda: L5 de *H. armigera*. Foto de la derecha: adulto de *H. armigera*



Figura 2. Homogeneización de la concentración con la dieta manualmente.



Figura 3. Dieta introducida en las celdas, con la larva del correspondiente estadio y cubierto por una tapa transpirable.



Figura 4. Larva de la izquierda viva, larva de la derecha muerta.

Houses for workers at mines in Cartagena-La Unión

M. Ortega, J. Calvo

Universidad Politécnica de Cartagena, Campus Alfonso XIII, Paseo Alfonso XIII, 48, C.P. 30203, Cartagena, España. E-mail: matilde.ortega@upct.es

Resumen

El “boom” minero vivido en Cartagena en el siglo XIX llevó consigo un gran aumento demográfico. En esos años se llevaron a cabo grandes movimientos migratorios de población provenientes de zonas donde también existía un gran auge minero, como Almería o Granada. Esta nueva población que se desplazó en busca de trabajo, trajo consigo nuevas costumbres como la afición por el cante jondo, origen del actual Cante de las Minas, y precisó nuevos asentamientos cercanos a las minas. Esta situación provocó que surgieran nuevas poblaciones como El Estrecho de San Ginés o El Beal, y que aumentara la construcción de nueva vivienda en zonas como la Unión. Estos nuevos habitantes se construirían ínfimas viviendas de características muy similares, realizadas con materiales muy pobres debido a los bajos salarios que les reportaban las minas, llegando incluso los mineros de nivel socio-económico más bajo a vivir muy próximos a las minas, en las denominadas “casa-cueva”. Paralelamente una burguesía adinerada, dueña de las minas, construyó nuevas y mucho más lujosas residencias, la mayoría influenciadas por el modernismo imperante en Europa.

Palabras clave: pobre; materiales; construcción.

Abstract

The mining “boom” experienced during the XIX century in Cartagena caused a great demographic increase. Population that needs new housing moves to there in a desperate search of new incomes. New villages rose such as “El Estrecho de San Gines” and “El Beal”, and the building of new houses in old zones such as La Unión was increased drastically. Negligible houses were built with similar characteristics, always constructed with poor materials due to lower incomes. Even in the case of the poorest miners, dwelling in caves very close to the mine, homes knowing as “casas-cueva”. Meanwhile a rich highborn people, the owners of the mines, built new and luxury houses, influenced by the modernist architecture wave that rules in Europe.

Keywords: poor; materials; construction.

1. Introducción

Este escrito versa sobre un capítulo dedicado a la vivienda dentro de la Tesis Doctoral: Criterios para la recuperación y puesta en valor del patrimonio minero. El caso de la Sierra minera de Cartagena-La Unión. Situaremos inicialmente el estado de la región en esos años.

El aumento de población llevado a cabo en la región de Murcia en la segunda mitad del siglo XIX fue debido a dos motivos principales, la reforma agraria liberal, que hizo aumentar las explotaciones agrarias y, en la mayoría de los casos, al “boom” minero. El crecimiento demográfico llegó a triplicarse en esos años en algunas zonas de la región como Cartagena [1].

Una gran población proveniente de las regiones limítrofes con tradición minera, como Almería, se desplazó hasta la región en busca de trabajo. En esa zona de la Sierra de Almagrera se explotó el plomo argentífero y posteriormente el hierro, por lo que existía una gran población con formación minera que buscaba otras zonas donde prosperar económicamente [2].

Ese movimiento migratorio trajo consigo el contagio de costumbres de la zona andaluza. El cante era algo frecuente en la vida de los trabajadores. Los campesinos andaluces cantaban malagueñas y madrugás en su trabajo. Igualmente los mineros necesitaban aliviar las horas de oscuridad y penurias dentro de la mina cantando sus penas en forma de taranta y otros cantos dolientes.

Pero el cante no solo estaba en la mina. Cuando el minero terminaba su dura jornada laboral se dirigía a la calle Mayor, a gastar el poco jornal que había ganado en los llamados Cafés Cantantes. Toda esta tradición flamenca ha desembocado en la existencia del actual Cante de las Minas.

En este contexto histórico de gran crecimiento urbanístico, finales del siglo XIX y principios del siglo XX, es donde se decide estudiar la vivienda minera obrera de la Unión.

2. Materiales y Métodos

La fuente principal de información de esta investigación se encontró en el Archivo Municipal de la Unión, en los planos de proyectos y en las licencias concedidas, ya que debido a la fuerte especulación urbanística muchas de las viviendas de esa época han desaparecido físicamente.

Las carpetas con expedientes de planos son muy abundantes hasta 1.900, mientras que a partir de 1.920 hay registrados muchos menos proyectos. Estos datos concuerdan con la situación económica de la zona, que perdió la mayor parte de su población en la gran crisis minera de principios de siglo. Muchos mineros llegaron a desguazar sus casas y venderlas por trozos para poder costearse el viaje de ida a nuevas ciudades en que buscar trabajo. Este fue otro de los motivos por los que queda aún menos patrimonio construido. Para dificultar más la investigación, en 1.940 el archivo sufrió un incendio en el que se perdió gran parte de documentación arquitectónica.

Se estudiarán aquí los distintos tipos de viviendas y buscaremos características comunes de las viviendas mineras de la época.

3. Resultados y Discusión

Tras analizar la documentación aún existente y visitar viviendas mineras en zonas como la Unión, Llano del Beal o Portmán se detallan los hallazgos encontrados.

3.1 Viviendas

Las diferencias más importantes encontradas tras un pormenorizado estudio en el Archivo de las carpetas de proyectos que se inician en el año 1.860, comienzo del “boom” minero, se describen a continuación.

Los proyectos se organizan en carpetas. En ellas existe una parte inicial en la que se explica de manera manuscrita las características del solar donde se va a construir, se señalan los promotores, linderos y las características básicas de las viviendas.

Todos los proyectos poseen un sello y número de expediente y al final del mismo se encuentra la firma del técnico y de los promotores. Algunos proyectos incluyen un documento de pago de tasas al estado. En muchos casos de cinco pesetas. En la parte final del expediente se localiza un plano de la vivienda. Ese plano en la mayoría de las veces contiene una planta de la misma. En proyectos más modernos en el tiempo

se aprecia cómo además de la planta se incluye uno o varios alzados. Los proyectos más ricos en detalles indican frecuentemente los anchos de las calles y los nombres de los vecinos con los que linda el solar. Además, incluyen una escala gráfica del plano y la firma del técnico suele aparecer en la mayoría de los casos.

Se ha comprobado como en muchas de las firmas aparecen maestros de obras como firmantes y no arquitectos. Es frecuente encontrar en muchas ocasiones la firma de maestros de obras como Fernando Egea o José Méndez. Este último realizó gran cantidad construcciones, desde viviendas a panteones de cementerio en la Unión. También firman atarifes como José Ballester (Fig. 1).

En otros planos sí se encuentra la firma de arquitectos tan conocidos como Carlos Mancha, Pedro Cerdán o Víctor Beltrí. Se aprecia que estos arquitectos firmaron en mayor número viviendas de alto nivel, pero su firma también se estampa en algunos proyectos de pequeñas viviendas. En estos planos se cuida mucho la delineación con detalles tales como sombreados en los vanos.

Los primeros proyectos encontrados del año 1.860 son firmados en su mayoría por José Polo y presentan unos planos menos definidos, medidos en varas y en los que no se señala la distribución de la vivienda, tan sólo la forma del solar con una línea. Algunos de esos planos llegaban a estar realizados mano alzada.

A partir de 1.865 sí se encuentra una mayor definición en la distribución interior y se usa la regla en el trazado de los planos, indicándose linderos y colocando anchos de muro diferentes, más gruesos los exteriores y finos los interiores.

En viviendas más actuales, de 1.890 en adelante, siempre se incluye planta y alzado, y la definición y trazado es mucho más limpia.

La mayoría de los proyectos encontrados se entiende que serían solicitados por los nuevos habitantes de la ciudad, muchos de ellos mineros, aunque también se han encontrado proyectos de locales, y almacenes destinados al comercio floreciente de la zona.

Durante la investigación también han salido a la luz proyectos de viviendas para mineros realizadas por los patronos. Existen ejemplos de este tipo en el proyecto de nueve viviendas seriadas proyectadas por Víctor Beltrí para los obreros de Don José Maestre en la Unión en el año 1.914.

La mayoría de las viviendas estudiadas poseen, muy poca fachada entre 5 y 7 metros y poco fondo. Por los que rondan los 50 metros cuadrados por vivienda.

Las viviendas más comunes son de una sola planta pues utilizan muros de carga de mampuesto o ladrillo. Solo en muy raros casos poseen dos plantas y casi siempre para proyectos de mayor envergadura o promovidos por caciques mineros. Las viviendas son pequeñas y suelen tener una distribución interior muy sencilla. En las más simples se accede desde la calle a una estancia que hace de salón desde la que se llega a un dormitorio y una cocina a ambos lados. Muchas veces la vivienda era simétrica. Otra distribución común encontrada es una vivienda con dos habitaciones a fachada una con la puerta y la otra con un vano.

En algunos casos existen más habitaciones y un patio trasero. Las fachadas incluyen el hueco de la puerta principal y el hueco de las ventanas. En casi todas las viviendas existe con un zócalo que llega hasta la altura de las ventanas. Los huecos de las ventanas y puertas, que eran de madera de la zona, solían tener un recercado.

Las cubiertas solían ser a dos aguas con teja curva o plana, estas últimas influencia de la tradición victoriana inglesa. Esta corriente arquitectónica se encuentra muy presente en la zona sur de España debido a la gran influencia de la colonización inglesa en zonas como Río Tinto. El uso de maquinaria *cornish* y estilo arquitectónico inglés con buhardillas y cubiertas inclinadas está muy presente en muchas viviendas modernistas de los ricos caciques, como en el Huerto de la las Bolas o incluso en las casetas de los castilletes de las minas extendidas por toda la sierra, como la mina Los Burros.

Las tejas se apoyaban sobre rastreles y vigas de madera. En algunas cubiertas se ha encontrado el uso de cañizo bajo las tejas como en la caseta de la mina Secretaria de la Peña del Águila y el uso de rollizos en los forjados. A veces se colocaba un falso techo realizado también con cañizo.

Los muros exteriores solían ser de mampostería enlucida o de ladrillo macizo. Era común el uso de ambos ya que muchas veces se reforzaba el mampuesto con el ladrillo trabado en los esquinas. Muchas veces si el minero poseía mayor estatus social sus casas se realizaban en ladrillo, realizando interesantes juegos con ladrillo trabado en las cornisas. Este detalle se aprecia en muchas de las casetas de minas del Cabezo Rajao.

Muy interesante para investigación acerca de la vivienda minera fue la visita a la casa-museo de Rogelio Mouzo Pagán donde se encontraron todos los restos de demoliciones de viviendas y construcciones mineras que ha ido recopilando a lo largo de su vida. Entre los restos se destacaban gran cantidad de restos de ladrillos macizos que eran utilizados en la construcción de las viviendas y en las casetas de obra de las minas. La mayoría del ladrillo era realizado en industrias del Algar como Pedro Peñalver, M. S. Sánchez Viñas o F. M. Pérez tal y como se aprecia en los sellos de los ladrillos. En otros restos arquitectónicos como las tejas también encontramos sellos de M. S. Sánchez Viñas del Algar o tejas planas de la Sociedad Industrial Moderna de Lo Triviño, Cartagena. Estos detalles nos enseñan la cantidad de industria que existía en la zona promovida por la minería.

Por otro lado, en esa época se crearon nuevos asentamientos como El Estrecho o El Beal donde se construyeron viviendas seriadas con características muy similares a las ya citadas. En algunos casos visitados, como en el Llano del Beal, se ha encontrado que algunas de ellas poseen muy interesantes fachadas con detalles geométricos tipo ménsulas, que hacen recordar influencias del modernismo geométrico vienés.

3.2. Casas cueva

Los mineros muy pobres tenían que vivir en zonas cercanas a la mina debido a que las grandes jornadas de trabajo no les dejaban tiempo para llegar a la ciudad. Además, debido a sus bajos jornales, no se podían permitir un terreno allí. En la gran mayoría de ocasiones utilizaron las cuevas que existían diseminadas por toda la sierra para crear sus hogares. En la actualidad todavía quedan restos en zonas como el Descargador, Roche o el paraje del Lazareto (Fig. 2).

Estas cuevas poseían distintas habitaciones para los miembros de la familia. No tenían mucha altura pues el minero medio era de baja talla debido a su mala alimentación y a que trabajaba en la mina desde niño al caber mejor en el tajo.

Las casas cueva poseían una zona fuera en la que existían plantaciones de secano como habas, guijas o tomateras con las que el minero subsistía. Muchas veces existía una valla con algo

de ganado como gallinas. El interior se recubría de cal para hacerlo más salubre [3].

En la zona de Roche y paraje el Lazareto se han realizado recientemente demoliciones de casas cueva debido a la especulación urbanística.

El estudio de la documentación encontrada en el Archivo municipal de la Unión y el estudio de las distintas viviendas que se mantienen en pie han llevado a corroborar que las viviendas son muy similares a las encontradas en otras zonas mineras cercanas estudiadas como en Almería. Casa pequeñas, con muros de mampostería o ladrillo, realizadas con materiales autóctonos y pobres.

La existencia en la zona de materiales que permitían la fabricación de tejas y ladrillos ha hecho que se utilicen de manera habitual estos elementos en la arquitectura mediterránea desde la época árabe. En la zona, siempre ha existido una gran industria relacionada con la construcción, como por ejemplo en el Algar.

Las cubiertas y carpintería solían realizarse en madera ya que en el siglo pasado existía una gran cantidad de árboles en los montes de la zona. Pero, la gran tala realizada durante el “boom” minero para el uso de la madera en las entibaciones mineras y las construcciones ha llevado a que en la actualidad casi haya desaparecido el bosque.

Otro de los resultados obtenidos es que se ha comprobado que una de las señas del crecimiento urbanístico de la zona es que no sigue normas geométricas ni regladas, ya que las pocas urbanizaciones que se construyeron rellenaban espacios de solares entre calles estrechas, al contrario que en otras ciudades de la época.

4. Conclusiones

El jornal de los mineros determinaba de manera inequívoca su vivienda. Los jornales más bajos condenaban a vivir en cuevas. Con un mayor jornal se podía acceder a viviendas de pequeño tamaño, que podía ir aumentando con el poder adquisitivo del minero. Paralelamente los ricos caciques mineros construían mansiones de gran tamaño influidas por el modernismo con detalles decorativos usando materiales nobles.

La vivienda minera usaba materiales autóctonos y de baja calidad con la que realizar viviendas de reducidas dimensiones donde pudiera vivir una

familia. Estas construcciones son muy similares a las construidas en zonas mineras cercanas como Almería o más lejanas como Huelva influidas por la cultura árabe y la minería inglesa como nos muestra el uso de la teja plana, más cara que la curva pero igualmente usada.

Tanto la documentación arquitectónica encontrada, como los planos del Archivo, han sido vitales para poder conocer el patrimonio, ya que la gran mayoría de las construcciones mineras han sido o están siendo derruidas.

Se debe preservar el poco patrimonio que queda aún en pie, ya sean casetas mineras, viviendas o castilletes si se quiere conocer lo que ha sido una parte vital en nuestra historia.

5. Agradecimientos

Agradezco enormemente la ayuda prestada por el cronista oficial de la Unión y técnico de la Biblioteca Francisco Ródenas, quien me facilitó muy amablemente acceso ilimitado a toda la documentación del Archivo de la Unión. Además agradezco a Rogelio Pagán la invitación a su colección privada y sus explicaciones sobre la minería unionense.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Colino Sueiras J. 1.994. Estructura económica de la región de Murcia. Ed: Universidad de Murcia. Pág: 29-30.
- [2] Pérez de Perceval M. 1.989. La minería almeriense contemporánea. Ed: Zéjel. Pág: 14.
- [3] Mouzo Pagán R. 2.009. Roche, el campo , la mina y la obra. Vivencias de un unionense. Ed: Francisco Jódar Liarte. Pág: 46.

Tablas y Figuras

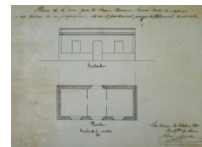


Figura 1. Plano vivienda de José Méndez, 1.891.

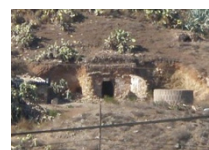


Figura 2. Casa-cueva en El Descargador.

Seed dormancy break and germination of southeast Iberian endemic *Narcissus tortifolius*

E.Martínez-Díaz, J.J.Martínez-Sánchez, M.J.Vicente

Departamento de Producción Vegetal, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España.

E-mail: ely.martinez@hotmail.com

Resumen

Muy pocos son los estudios sobre ruptura de latencia y germinación en semillas del género *Narcissus* dentro del grupo de las monocotiledóneas. El objetivo principal de este estudio fue determinar el tipo de latencia en *Narcissus tortifolius* y conocer los requerimientos para vencerla. El crecimiento del embrión y la germinación de las semillas fueron estudiados bajo test de estratificación fría (5°C) y cálida (25°C) durante 60 días y post-incubación de las semillas a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 y 20/12°C) que se ensayaron tanto con 12 horas de luz como en oscuridad permanente, durante 30 días. La longitud media del embrión en semillas frescas fue de 1,77 mm. Los embriones completaron su desarrollo cuando se sometieron a una estratificación cálida y las semillas germinaron en todos los rangos de temperatura alcanzándose los mayores valores de germinación a 15°C/ luz (95%). Sin embargo, los embriones crecieron solamente un poco en semillas estratificadas en frío que solo germinaron un 3% de las incubadas a 15°C/oscuridad. Se concluye que las semillas de *Narcissus tortifolius* tienen una latencia morfológica y que para romper la misma es necesario una estratificación cálida.

Palabras clave: Capacidad germinativa; crecimiento del embrión; estratificación.

Abstract

There are few studies on seed dormancy/germination in the large monocot genus *Narcissus*. A primary aim of this study was to determine the kind of seed dormancy in *Narcissus tortifolius* and relate the dormancy breaking. Embryo growth and seed germination were studied under test cold stratification (5°C) and warm stratification (25°C) for 60 days and post incubation of seeds at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 y 20/12°C). At each temperature, seeds were incubated at 12h/12 h light/dark regime and in continuous darkness, for 30 days. Mean embryo length in fresh seeds was 1,77 mm. Embryos grew to full size when they were warm stratified and seed germinated in all temperature ranges reaching the highest values de germination at 15°C/light (95%). However, the embryos grew only slightly in cool stratified seeds germinated only 3% of the incubated at 15°C/darkness. We conclude that the seed of *Narcissus tortifolius* have a morphological dormancy and break it warm stratification is necessary.

Keywords: Germination capacity; embryo growth; stratification.

1. Introducción

Las semillas de muchas especies de plantas de zonas templadas son latentes en el momento de la dispersión, y unos requerimientos específicos de temperatura deben darse para que puedan salir de la latencia y germinar [1]. La latencia previene la germinación en momentos en que las condiciones son adecuadas para germinar, pero con escasa probabilidad de éxito para el establecimiento de las plántulas [2]. Por lo tanto, la latencia es un rasgo adaptativo que optimiza la emergencia de las mismas a lo largo del tiempo.

Así, el conocimiento de los mecanismos de ruptura de la latencia de una especie es un factor

importante a la hora de diseñar protocolos de propagación ex-situ para reforzar las poblaciones de la especie objeto de estudio.

De acuerdo con Baskin y Baskin [1], la familia **Amaryllidaceae** tiene embriones lineares subdesarrollados que son plenamente diferenciados, así ellos necesitan crecer antes de que las semillas puedan germinar. Sin embargo, datos sobre los requerimientos para el crecimiento del embrión son particularmente escasos en esta familia.

El género *Narcissus* L. pertenece a la familia de monocotiledóneas Amaryllidaceae, la cual incluye unas 900 especies dentro de 60 géneros

[3]. *Narcissus tortifolius* Fern. Casas está catalogada como “Vulnerable” en el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia (BORM 50/2003) y sus poblaciones se encuentran en las sierras litorales de Cartagena (La Azohía, Isla Plana, Sierra del Puerto) y en los cabezos de las inmediaciones de Fuente Álamo.

Con este trabajo se pretende mejorar el conocimiento sobre las condiciones que posibilitan el crecimiento del embrión, así como la germinación, en especies con embriones subdesarrollados.

Por consiguiente, los objetivos de este estudio son 1) efecto de la temperatura sobre el crecimiento del embrión y 2) influencia de la temperatura de estratificación y condiciones de iluminación sobre la capacidad germinativa de las semillas a diferentes temperaturas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal

Las plantas de *Narcissus tortifolius* pueden alcanzar 40 cm de altura con bulbos de 1 x 4,6 cm de diámetro, que presentan numerosas túnicas (restos basales de las hojas de años anteriores). Hojas de hasta 40 cm de longitud y 0,7 cm de anchura, planas, retorcidas sobre sí mismas [4]. El escapo de 4-20 cm algo comprimido y liso, que puede tener de 2-10 flores con tépalos y corona de color blanco [5]. Su fruto es una cápsula que puede tener de hasta 50 semillas. Esta especie forma parte de matorrales, espartizales y tomillares, sobre diversos sustratos (arcillas de descalcificación, calizas y filitas) en suelos generalmente poco desarrollados.

2.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del embrión

Las semillas que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos fueron recolectadas de la población de Fuente Álamo.

En primer lugar, se midió la longitud media del embrión en 23 semillas recién recolectadas colocadas en una placa Petri de 9 cm durante 24 h, sobre dos capas de papel de filtro húmedo con agua destilada. Los embriones fueron extraídos de semillas embebidas con un bisturí y sus longitudes medidas usando una lupa equipada con un micrómetro. Este tratamiento es el control 0.

A continuación se colocaron 24 semillas por placa sobre dos capas de papel de filtro humedecido con agua destilada y precintadas con Parafilm. Se

utilizaron dos placas por tratamiento. Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos: estratificación fría (5°C/húmeda) y estratificación caliente (25°C/húmeda) y un control en seco a 20°C. Las semillas se incubaron durante 60 días, y posteriormente semillas sanas fueron extraídas de cada temperatura y sus embriones extirpados y medidos. La longitud media y el error estándar fueron calculados en cada muestra de 25 embriones.

2.3 Influencia de la temperatura de estratificación y condiciones de iluminación sobre la capacidad germinativa de las semillas.

Para ello se prepararon 10 lotes (5 lotes con 12 h de luz/12 de oscuridad y 5 lotes en oscuridad total) de 4 placas cada uno con 25 semillas por placa para cada tratamiento de estratificación; fría/húmeda, cálida/húmeda y un control (T^aambiente/seco), que se incubaron durante 60 días y posteriormente cada lote a 5, 10, 15, 20, 25 y 20/12°C durante 30 días [1] en cámaras de germinación (Sanyo MLR-351H, Osaka, Japan) con control digital ($\pm 0,1^\circ\text{C}$, luz fluorescente blanca fría de 20000 lx). El recuento de las semillas germinadas se realizó cada 2 días en los tratamientos con fotoperiodo de 12 horas de luz, retirando de las placas las semillas que iban germinando. El criterio para decidir que se había producido la germinación fue la emergencia de la radícula. Para los tratamientos en condiciones de completa oscuridad las placas se taparon con 2 hojas de papel de aluminio y se contaron las semillas germinadas al final del ensayo.

2.4 Análisis estadístico

Un análisis multivariante de la varianza se utilizó para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento del embrión y de la germinación de las condiciones utilizadas en cada ensayo. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, EE.UU). La normalidad y la homocedasticidad de los datos fueron verificados, y los porcentajes de germinación se transformaron en arcoseno. Cuando los efectos principales eran significativos, las diferencias fueron probadas por la prueba de comparación múltiple de Tukey a $P \leq 0,05$.

3. Resultados y Discusión

Las semillas de *N. tortifolius* recién recolectadas tienen un embrión subdesarrollado en el momento de la dispersión al final de la primavera. La longitud media del embrión es de

1,77±0,19 mm y tienen que crecer hasta alcanzar al menos 1,98±0,27 mm (Tabla 1) para ser susceptibles de germinar (momento en el cual se produce la emergencia de la radícula). Así, las elevadas temperaturas estivales proporcionan las condiciones apropiadas que conllevan a la germinación cuando las temperaturas descienden en otoño o al principio de invierno. Sin embargo, los embriones crecen poco 1,90±0,23 mm (Tabla 1)

Los resultados ponen de manifiesto que la estratificación fría durante 60 días y posterior incubación de las semillas en todos los regímenes de temperatura durante 30 días impidió la germinación de las mismas excepto a 10°C y 15°C en oscuridad, alcanzándose tan sólo 1 y 3%, respectivamente (Tabla 2).

La estratificación cálida durante 60 días favoreció significativamente la germinación en todas las temperaturas ensayadas, obteniéndose unos valores mayores a 20/12 y 15 °C en luz del 75 y 95% (Tabla 3), frente al 26 y 71% obtenido en el control con un 26 y 75% (Tabla 4) respectivamente.

En general, la oscuridad favoreció la germinación de las semillas en todas las temperaturas ensayadas excepto a 25 °C con respecto a la luz (Tabla 4) Del mismo modo ocurre cuando las semillas se someten a una estratificación cálida y posterior incubación a 10°C donde se puede observar que en oscuridad germinan más semillas que en luz, un 95% frente a un 51 % respectivamente. Este efecto de la luz implica que las semillas no sean susceptibles de germinar hasta ser enterradas, suponiendo una ventaja de cara a la supervivencia de las plántulas ya que en periodos de sequía serían menos vulnerables que aquellas que se encuentran en la superficie [6].

Por consiguiente, las semillas tienen latencia morfológica (LM), es decir, los embriones tienen que crecer dentro de las semillas maduras antes de que la germinación sea posible [1].

Desde un punto de vista ecológico, este nivel de latencia supone una excelente adaptación a regiones templadas [7;8;9]. Así, aunque la dispersión de la semilla se produce a principios de la primavera, la presencia de un embrión subdesarrollado y latente evita que la semilla pudiera germinar tras una tormenta de verano, que si bien le aportaría una cierta humedad inicial, el estrés hídrico estival acarrearía la muerte de las semillas germinadas. De este modo, la germinación se retrasa hasta otoño,

momento en el que las condiciones de humedad son más propicias para la supervivencia.

4. Conclusiones

Para la producción de plantas a partir de semillas es necesario romper la latencia de las mismas en cámaras de germinación sometiendo a un periodo de estratificación cálida durante 60 días con el fin de vencer la situación en el campo.

5. Agradecimientos

Agradecer la estimable ayuda técnica ofrecida por mi compañera y gran amiga Naveira, D., así como a Macarena y José Luis.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Baskin CC., Baskin JM. 1998. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, CA: Academic Press.
- [2] Bewley JD., Black M, Halmer P. 2006. The encyclopedia of seeds: science, technology y uses. Oxon, Wallingford, UK. CAB International.
- [3] Mabberley DJ. 2008. Mabberley's plant-book. A portable dictionary of plants, their classifications, y uses. (3rded.). New York. Cambridge University Press.
- [4] Carrión Vilches, MA., Sánchez-Gómez, P., Hernández González, A., Guerra, J. 2002. Datos sobre la biología de *Narcissus tortifolius* Fern. Casas (Amaryllidaceae), endemismo del sureste de la Península Ibérica. Anales de Biología 24: 115-120.
- [5] Barra, A., Blanco, E., Grijalbo, J. 2011. Narcisos ibéricos: junquillos, campanillas, capirotos o trompones. Revista Quercus 301: 40-52.
- [6] Thanos, CA., Georghiou, K., Douma, DJ., Marangaki, CJ. 1991. Photoinhibition of seed germination in Mediterranean maritime plants. Annals of Botany 68: 469-475.
- [7] Baskin CC., Baskin JM. 1983. Germination ecophysiology of the eastern deciduous forest herbs: *Hydrophyllum macrophyllum*. The American Midland Naturalist 109: 63-71.
- [8] Baskin CC., Baskin JM. 1985. Germination ecophysiology of *Hydrophyllum appendiculatum*, a mesic forest biennial. American Journal of Botany 72: 185-190.
- [9] Kondo, T., Miura, T., Okubo, N., Shimada, M., Baskin, C.C., Baskin, JM. 2004. Ecophysiology of deep simple epicotyl morphophysiological

dormancy in seeds of *Gagea lutea* (Liliaceae).
Seed Science Research 14: 371- 378.

Tablas y Figuras

1. Efecto de la temperatura de estratificación sobre la longitud del embrión

Tratam.	Longitud embrión (mm)
Control 0	1,77± 0,19b
Estrat. 4°C	1,90±0,23ab
Estrat.25°C	1,98±0,27c
Control 20°C	1,58±0,20a

* Letras diferentes para valores dentro de una columna indican diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)

Tabla 2. Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la germinación de semillas sometidas a una estratificación fría

Tª	%Germinación	
	Luz	Oscuridad
10°C	0±0,00aA	1±2 abB
15°C	0±0,00aA	3±2 bB
20°C	0±0,00aA	0±0,00aA
25°C	0±0,00aA	0±0,00aA
20/12°C	0±0,00aA	0±0,00aA

* Letras diferentes en mayúsculas con los valores dentro de una columna indican diferencias significativas entre sí, y las diferentes letras minúsculas para los valores dentro de una fila indican una diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)

Tabla 3. Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la germinación de semillas sometidas a una estratificación cálida (°C)

Tª	%Germinación	
	Luz	Oscuridad
5°C	50±10,07bA	22±4,00aB
10°C	51±8,87bA	95±6,00cB
15°C	95±5,03cA	89±6,83bcA
20°C	4±5,66aA	8±4,62aA
20/12°C	75±7,57bA	73±19,97bA

* Letras diferentes en mayúsculas con los valores dentro de una columna indican diferencias significativas entre sí, y las diferentes letras minúsculas para los valores dentro de una fila indican una diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)

Tabla 4. Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la germinación de semillas sometidas a una estratificación a 22°C (Tª ambiente)

Tª	%Germinación	
	Luz	Oscuridad
10°C	32±8,64bA	81±3,83dB
15°C	71±6,00cA	93±6,00eB
20°C	2±2,31aA	28±9,80bB
25°C	0±0,00aA	0±0,00aA
20/12°C	26±8,33bA	55±6,83cB

* Letras diferentes en mayúsculas con los valores dentro de una columna indican diferencias significativas entre sí, y las diferentes letras minúsculas para los valores dentro de una fila indican una diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)

Effect of maternal environmental factors on seed dormancy of *Astragalus nitidiflorus*

F. Segura, M.J. Vicente, J.A. Franco, J.J. Martínez-Sánchez

Departamento de Producción Vegetal, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Spain. E-mail: frankyct@hotmail.com

Resumen

La viabilidad y latencia de semillas de *Astragalus nitidiflorus* fue estudiada durante ocho años consecutivos para determinar si la elevada latencia física detectada en los primeros estudios era una característica fija. El efecto de factores maternos como la posición del fruto en la inflorescencia, posición de la semilla en el fruto o edad de la planta madre fueron estudiados. Para evaluar el efecto del estrés hídrico, plantas creciendo en macetas bajo condiciones de invernadero fueron bien irrigadas o estresadas durante la fructificación (mayo a junio) y se observó la germinación de ambos tipos de plantas. A su vez, la precipitación natural entre mayo y junio en la poblaciones de campo fue registrada y relacionada con la latencia de las semillas naturales. Los resultados mostraron que la latencia física no debería considerarse una característica fija en las semillas de *A. nitidiflorus* ya que factores maternos medioambientales como la sequía o edad de la planta madre influyen en la proporción de semillas que entran en latencia.

Palabras clave: Sequía; efecto materno; edad de la planta; experimento de riego; banco edáfico.

Abstract

Viability and seed dormancy of *Astragalus nitidiflorus* were tested during eight consecutive years in order to determine if the high physical dormancy detected in the firsts studies was a fixed trait. Effects of maternal factors as fruit position in the inflorescence, seed position in the fruit or age of the mother plant were tested. To study the effect of water stress, plants growing in pots under greenhouse conditions were well irrigated and stressed in the fruiting stage (May to June) and seed germination from both type of plant was tested. Also field rainfall from May to June in field population were recorded during the study period and related with dormancy of wild seeds. Results showed that physical dormancy should not be considered as fixed traits in *A. nitidiflorus* seeds because maternal environmental factor as drought or mater plant age influence the proportion of seeds that enter dormancy.

Keywords: Drought; maternal effect; plant age; irrigation experiment; soil seed bank.

1. Introduction

In most plant species, seeds vary in their degree of germination between and within populations and between and within individuals. Some of these variations may be genetic, but much of them are known to be phenotypic [1]. The so-called maternal environmental effects on germination is described as the phenotypic effects caused by the environmental conditions that would produce seeds that reached different germination percentages and/or had different germination requirements [2]. Following [1] these conditions consist of a combination of the microenvironment experienced by the seed due to its position on the mother plant and the abiotic environment of the plant. Seed dormancy allows the long-term burial of seeds and consequently the formation of persistent soil seed bank [3], enhancing seedling survival by delaying germination to avoid competition from established plants or unfavourable weather conditions.

Astragalus nitidiflorus Jiménez Mun. et Pau (Leguminosae) is a perennial herb endemic to the province of Murcia listed as Critically Endangered in accordance with IUCN (2001) criteria. Previous germination studies showed physical dormancy imposed by a hard coat (internal report). This dormancy type is widely represented in Leguminosae, so we considered the physical seed dormancy in *A. nitidiflorus* as a proven fact. However, from 2005 began studies on the biology of this species [4,5,6], and the last one showing that seed have hard coat but the species is unable to form long-term persistent soil seed bank.

The aim of this paper was to analyse the physical dormancy and germination of *A. nitidiflorus* seeds from different yields and study the effects on seed dormancy of some maternal factors such as *i*) fruit position in the inflorescence and seed position in the fruit, *ii*) the age of the mother plant, and *iii*) water stress in the mother plant.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and study site

Astragalus nitidiflorus is a perennial herbaceous legume short-lived that germinates in autumn. In mature plants flowering begins in March and continues until the end of May, with the maximum flowering moment occurring on April. Fruits are indehiscent legumes that take about two months to ripen and dispersion takes place from early July [4]. The study area has a Mediterranean type climate with semiarid conditions. The mean annual rainfall is around 300 mm and annual ETP of 1,319 mm. The annual drought period lasts normally five months.

2.2. Germination experiments

In order to know the variation in the degree of germinability between years, ripe fruits were harvested each July from 2006 to 2013 in the largest known population (37° 40' N, 1° 08' W). Seeds were removed from the fruits by hand and conserved in the Seed Bank of the Technical University of Cartagena at 4°C. In July 2013 four replicates of 25 seeds each per year were placed on moistened filter paper in Petri dishes and incubated in a growth chamber at 15° and 12-h photoperiod. The number of germinated seeds was registered every two days for one month and recorded as non-dormant viable seeds (N-DVS). Non-germinated seeds were scarified with sandpaper to break physical dormancy and then placed back on moist filter paper. Those scarified seeds that germinated were recorded as dormant viable seeds (DVS), and those that did not germinate as non-viable seeds (N-VS).

2.3. Maternal environmental effect experiments

To evaluate the effects on germinability of position of the fruit positions in the inflorescence and the seed positions inside the fruit, 20 plants two years old were randomly selected and their ripened fruits collected in July 2013. From each plant, fruits were collected from five different inflorescences in two morphological positions: the basal and apical position. From each fruit, seeds were collected separately from the middle and from the apical end. At the same time, fruits from ten plants two years old and from the same number of plants three years old were collected to test the effect of the age of the mother plant on germinability. Germination response was tested as above in seed germination experiments.

Considering that our study on the germination characteristics was always conducted with seeds collected in the same location we focus the study on the only environmental factor that varied significantly between years, the rainfall. To check the effect of rain on seed dormancy a correlation was made between seed germination and the annual amount of rainfall. However no correlation was obtained ($F_{1, 6} = 2.052$, $P = 0.202$, $R^2 = 0.255$). Germination is highly responsive to environmental stress experienced during seed maturation on the maternal plant, and in some species it was shown that the last 5-15 days of seed maturation is the critical time [1]. Taking into account that the maximum flowering moment occurs on April and that the fruits take about two months to ripen, the period of maximum influence of water availability on *A. nitidiflorus* germinability is more likely to occur during the months of May and June. Then, another correlation analysis was made between seed germination and amount of rainfall in May-June.

Also one experiment was carried out in greenhouse to test the effect of maternal drought on seed dormancy. *A. nitidiflorus* plants were grown in a greenhouse. Plants proceeded from seed collected in July 2011 in the field population and seeded in 48 PVC 2.5 L pots filled with a mixture of black peat and soil from the habitat (6:1 vol.) and arranged on metal crop tables in six rows of 8 pots each. All pots were well irrigated until April 2012. So, from April 2012 two irrigation treatments were implemented, called "well irrigated plants" (WIP) and "stressed plants by drought" (SPD). At the fruiting stage (late July) fruits from both treatments were collected separately and seeds were removed by hand in order to test germination behaviour. Then, four replicates of 25 seeds each per irrigation treatment were plated and their germination responses were tested.

2.4. Statistical analysis

Germination data do not fit a normal distribution, so comparisons of non-dormant viable seeds (N-DVS), dormant viable seeds (DVS), and non-viable seeds (N-VS), between years were performed using Kruskal-Wallis non-parametric test at $P < 0.05$. To analyse the effects of fruit and seed position, plant age and water availability a Mann-Whitney U non-parametric test at $P < 0.05$ were performed. Also, in order to analyse the effect that water stress on the germination of seeds collected from 2006 to 2013 in the field regression curve analyses were performed.

All data was analysed using the statistical package SPSS 20.0 for Windows, and the graph-analysis performed by the software Sigmaplot Version 10.0.

3. Results and Discussion

Seed germination of *A. nitidiflorus* varied greatly depending on the year in which they were yielded ($P < 0.001$). In 2007, 2012, and 2013 the proportion of seeds with physical dormancy (DVS) were 97%, 73% and 87% respectively while in 2010 and 2011 only were 13% and 16%.

Results also showed that fruit position on the inflorescence had no effect on the proportion of dormant seed ($P=0.095$) and the same happened as regard the seed position in the fruit ($P=0.663$). However, the age of the mother plant had a significant effect in the proportion of non-dormant viable seeds ($P = 0.018$) and plants at the first fruiting produce seeds with higher germination percentages ($19 \pm 6.8\%$) that oldest plants ($1 \pm 2\%$). But the most influential effect on seed germination characteristics clearly was the availability of water at the fruiting stage. Seeds from plants well-irrigated showed total absence of dormancy (all viable seeds -87%- were non dormant) while those from stressed plants by drought showed less viability (only 68% of them were viable) and the proportion of non-dormant seed did not reach 20%.

In the natural population, the percentage of germinated seeds was also significantly affected by the amount of rainfall during the May-June period ($P < 0.001$), increasing seed germination with the amount of rainfall according to a quadratic curve ($F_{1, 6} = 8.911$, $P = 0.022$, $R^2 = 0.781$). When rainfall is less than 10 mm in the period from May to June ("dry springs" in 2007, 2009, 2012, and 2013) the average germination percentage was 7.4 ± 1 , while when rainfall exceeds 25 mm ("wet springs" in 2006, 2008, 2010, 2011) this value increased to 54.5 ± 11.6 . However, germination was not affected by total annual rainfall ($F_{1, 6} = 2.052$, $P = 0.202$, $R^2 = 0.255$).

Our results showed that the age of mother plants has effect on seed germination, so that older plants produce viable seeds with lower germination percentages in comparison with those from younger plants. This fact is known from a large number of annual species and many examples are cited in [1] supporting the idea that senescence influence seed dormancy. But senescence effect is not a good explication in *A.*

nitidiflorus because it is a perennial herbaceous species and seed from plant with different age were collected at the same time. *A. nitidiflorus* plants at the first fruiting stage (two years old) produced an average of 1,500-3,000 seed per plant while plants at the second fruiting stage (three years old) produced 8,000-10,500 seed [4], we could explain our result taking into account the likely negative relationship between maternal fecundity and offspring germination fraction because the risk of experiencing sibling competition increases with increase seed family size. However, in semi-arid land there are no relationship between maternal fecundity and germination. Results suggest that the age structure of the population should be an important factor to consider when estimating the annual replenishment of banks soil seed. At the same time, in perennial species, maternal effects have the potential to influence the age structure of populations, which in turn would influence projected population growth rates, probability of population extinction and genetic variation.

In other hand, results showed that seeds produced in dry springs have a high rate of physical dormancy and are possibly that they accumulate in the soil seed bank, while in wet years seeds are more water permeable being able to germinate when environmental conditions are favourable. The type of response to drought conditions during seed development seems dependent on the kind of dormancy involved. Seeds of *A. nitidiflorus* are known to have physical dormancy due to suberized and impermeable to water seed coat, which is commonly known as hardseedness and is typical of many species from families such as Fabaceae, Malvaceae, Chenopodiaceae and Liliaceae. When dormancy is imposed mechanically by a thick seed coat, as in our case, drought usually increases its thickness, thereby contributing to a reduced germinability [3]. Some authors assume that competition is the ultimate reason for the existence of such maternal environment effects and hypothesized that there is a negative relationship between favourable seasons and seeds germination and then the offspring may reduce negative effects of crowding in the following year. However this hypothesis is true in climate with high precipitation regimes but not for semi-arid ecosystem where plant interactions can be neutral or positive. The total annual rainfall, the amount of rain in each rainfall, and the time between rainfalls are highly variable in semi-arid areas [2]. This is the case of our study

where rainfall from 2005 to 2013 period was an average of 306 mm and massive offspring germination is observed in some autumns. The ecological implication of these differences is that seeds produced in a dry spring are likely to have slower rate of dormancy release than those produced in a wet spring. Thus, seeds from a dry year may be more likely to become part of the persistent soil seed bank than those produced in a wet year. This mechanism is responsible for long-term seed dormancy but also provide sufficient germinable seeds for infestation when conditions become favourable. Our findings show that drought from May to June could prevent the emergence of most of the offspring with the first autumn rains. Results showed in this paper are consistent with the population dynamics of *A. nitidiflorus*, characterized by highly variable population censuses between years and specific episodes of massive emergency of seedlings as well as the fact that the soil seed bank of this species oscillate greatly depending on the demographic fluctuations in short-term population shown by [6]. The maximum lifetime of a *A. nitidiflorus* plant is four years and in that time the plant is fruitful three times, so the probability that different yields are affected by plant age or for different drought periods is very high. Then, the offspring will have a very big plasticity to closely match the changing environment conditions of these unpredictable environments.

4. Conclusion

Physical dormancy should not be considered as a fixed trait in *A. nitidiflorus* seeds because maternal environmental factor as drought or mater plant age influence the proportion of seeds that enter dormancy and become part of the seed bank. We call the attention of the researchers to not fall into the mistake of considering dormancy as a fixed trait even though some germination tests demonstrate it. So, the age structure of the population should be an important factor to consider when

estimating the annual replenishment of soil seed banks. Besides, the amount of rainfall in late spring need to be considered in order to planning strategies for managing the endangered populations of *A. nitidiflorus* and for others species with similar characteristic to this species.

5. Acknowledgements

This work has been financed by the Fundación Séneca de la Región de Murcia (project 1186/PI/07). We thank Dr. Bañón for his assistance in the irrigation experiment.

6. References

- [1] Gutterman Y. 2000. Maternal effects on seeds during development. En: *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Ed: CABI Publishing. Wallingford, UK. Pág.: 59-84.
- [2] Shem-Tov S., Gutterman Y. 2003. Influence of water regime and photoperiod treatments on resource allocation and reproductive successes of two annuals occurring in the Negev Desert of Israel. *J. Arid Environ.* 55: 123-142.
- [3] Baskin C.C., Baskin J.M. 1998. *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and germination*. Ed: Academic press. San Diego, CA.
- [4] Martínez-Sánchez J.J., Segura F., Aguado M., Franco J.A., Vicente, M.J. 2011. Life history and demographic features of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered species. *Flora.* 206: 423-432.
- [5] Vicente M.J., Segura F., Aguado M., Migliaro D., Franco J.A., Martínez-Sánchez J.J. 2011. Genetic diversity of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation. *Biochem. Syst. Ecol.* 39: 175-182.
- [6] Segura F., Martínez-Sánchez J.J., Aguado M., Franco J.A., Vicente M.J. 2014. Could recently locally extinct population patches of *Astragalus nitidiflorus* regenerate from the soil seed bank? *J. Arid Environ.* 110: 75-78.

Current status of insecticide resistance in *Myzus persicae* in Spain

A. Belando, I. Moreno, P. Bielza

Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203, Spain. ana_belando@hotmail.com

Resumen

Myzus persicae, el pulgón del melocotonero, es una plaga de importancia mundial de una amplia gama de cultivos herbáceos, hortícolas, y frutales, por sus daños directos y por su capacidad de transmitir más de 100 virus de las plantas. En España no se ha realizado nunca un estudio del estado de la resistencia a insecticidas en una plaga agrícola tan importante como *M. persicae*. Por todo ello es imprescindible conocer bien el estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de *M. persicae* en los diferentes cultivos en los que causa daños importantes, así como los mecanismos de resistencia implicados. Por tanto el objetivo de este trabajo es estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam, y los insecticidas flonicamid, spirotetramat, pymetrozina y azadiractina, en poblaciones de *Myzus persicae* de cultivos frutales y hortícolas de la Región de Murcia y otras poblaciones españolas. Los resultados obtenidos muestran como para el imidacloprid la población llamada BS ha presentado una LC₅₀ de 37,81 ppm. Para el tiametoxam observamos como las poblaciones BS y CH01 obtienen una LC₅₀ superiores al del resto de poblaciones bioensayadas para este insecticida, siendo su valor de 65,04 ppm y 48,16 ppm respectivamente. Para el flonicamid las cuatro poblaciones se han comportado de manera similar, donde apenas se pueden apreciar diferencias significativas entre ellas, destacando la población de AS01 que ha obtenido una LC₅₀ de 12,74 ppm, ligeramente superior en relación a las demás poblaciones.

Palabras clave: Flonicamid; tiametoxam; imidacloprid.

Abstract

Myzus persicae, the peach aphid, a pest of global importance to a wide range of arable, horticultural crops, fruit trees, for their direct damage and its ability to transmit more than 100 viruses of plants. In Spain there has never made a study of the status of insecticide resistance in *M. persicae* as important as agricultural pest. Therefore, it is essential to know the condition of insecticide resistance in populations of *M. persicae* in the different cultures in which cause significant damage and resistance mechanisms involved. Therefore, the objective of this work is to study the potential development of resistance to neonicotinoid imidacloprid and thiamethoxam, and flonicamid insecticidas, spirotetramat, pymetrozine and azadirachtin, in populations of *Myzus persicae* of fruit and vegetable crops in the region of Murcia and other Spanish populations. The results show as Imidacloprid people call BS presented a LC₅₀ of 37.81 ppm. Thiamethoxam to observe how the populations BS CH01 LC₅₀ get a higher population than the rest bioensayadas for this insecticide, and its value of 65.04 ppm and 48.16 ppm respectively. Flonicamid for the four populations have behaved similarly, where you can see just mean differences between them, stressing the AS01 population has obtained a LC₅₀ of 12.74 ppm, slightly higher compared to other populations

Keywords: Flonicamid; tiametoxam, imidacloprid.

1. Introducción

El pulgón del melocotonero, *Myzus persicae*, es una plaga de importancia mundial de una amplia gama de cultivos herbáceos, hortícolas, y frutales, por sus daños directos y por su capacidad de transmitir más de 100 virus de las plantas [1]. Excepto en cultivos hortícolas en invernaderos, su control se basa casi exclusivamente en la aplicación de insecticidas y, como resultado, esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados, carbamatos y piretroides [2]. Los mecanismos moleculares de

resistencia a los insecticidas en *M. persicae* incluyen la sobreproducción de carboxilesterasas de desintoxicación (E4 o FE4) que confiere resistencia principalmente a organofosforados y dos formas de resistencia en el punto de acción [2]. Una de ellas es una mutación de la proteína de la acetilcolinesterasa (acetilcolinesterasa modificada, MACE por sus siglas en inglés) dando insensibilidad a los dimetil-carbamatos (ej. Pirimicarb) [2]. La otra es una mutación del canal de sodio dependiente de voltaje (resistencia Knockdown, kdr) dando resistencia a los piretroides [2]. Los neonicotinoides tales como imidacloprid, tiametoxam, clotianidina y

acetamiprid no se ven afectados por estos mecanismos, y son actualmente el principal medio de control. Los neonicotinoides han demostrado ser notablemente resistentes al desarrollo de la resistencia y se han mantenido muy eficaces contra *M. persicae*. Se han encontrado poblaciones con susceptibilidad reducida a compuestos neonicotinoides (10-40 veces la resistencia) en Europa, los EE.UU. y Japón [3-5]. Sin embargo, en la actualidad los niveles de resistencia descritos tienen un significado práctico limitado, ya que son insuficientes para poner en peligro la eficacia en campo de estos insecticidas [3,5].

Recientemente, se han utilizado enfoques bioquímicos y genómicos para investigar la resistencia a los neonicotinoides de ~40 [6,7]. La resistencia se asocia con múltiples duplicaciones de un solo gen P450 (CYP6CY3), con pulgones resistentes que llevan ~18 copias del gen en comparación con las dos copias se encuentran en los pulgones susceptibles [14]. Sin embargo, los estudios de unión a ligando y de secuenciación no aportaron pruebas de que la modificación estructural del receptor de nicotínico de la acetilcolina (nAChR; el punto de acción de los neonicotinoides) contribuyera a la resistencia en este clon

En 2009, se descubrió sobre melocotoneros en el sur de Francia un clon de *M. persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides que compromete la eficacia en campo de los miembros de esta clase de insecticidas [12]. La resistencia es conferida tanto por la desintoxicación mediada por P450s y por la insensibilidad del punto de acción de los neonicotinoides. Éste es el primer ejemplo de la resistencia a los neonicotinoides en el punto de acción encontrada en poblaciones de campo. La comparación de la secuencia de nucleótidos de seis genes de subunidades del nAChR (Mpq1-5 y Mpβ1) de clones de pulgones resistentes y susceptibles, reveló un único punto de mutación en la región D del bucle de la subunidad β1 del nAChR del clon resistente, causando una sustitución de arginina a treonina (R81T) [12].

Dadas las graves consecuencias de esta mutación para un control efectivo de las poblaciones de esta plaga, se realizó un seguimiento de su expansión geográfica. La mutación se ha ido extendiendo, y hasta la fecha se ha encontrado en Italia, Francia y España [13]. Dentro de España se ha encontrado en plantaciones de frutales de hueso de Cataluña, Aragón, Murcia y Extremadura.

En España no se ha realizado nunca un estudio del estado de la resistencia a insecticidas en una plaga agrícola tan importante como *M. persicae*. Obviamente tampoco se conoce la prevalencia en las poblaciones españolas de los mecanismos de resistencia conocidos (a carbamatos, fosforados y piretroides) ni de los nuevos (a neonicotinoides), ni si pudieran presentarse algunos nuevos

Por todo ello es imprescindible conocer bien el estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de *M. persicae* en los diferentes cultivos en los que causa daños importantes, así como los mecanismos de resistencia implicados, con el fin de diseñar estrategias adecuadas de tratamientos para un uso sostenible de los fitosanitarios. Por tanto se pretende estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam, y los insecticidas flonicamid, spirotetramat, pimetrocina y azadiractina, en poblaciones de *M. persicae* de cultivos de frutales y hortícolas de la Región de Murcia y otras regiones españolas.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos con imidacloprid, tiametoxam, y flonicamid.

2. Materiales y Métodos

2.1 Poblaciones

Se recogieron 4 poblaciones (BS, CH01, JM03 y AS01) de *M. persicae* de cultivos frutales de las principales zonas productoras (Lérida, Zaragoza y Murcia), abarcando diferentes escenarios de presión insecticida. Las poblaciones se criaron sobre plantas de pimiento en jaulas.

2.2 Insecticidas

Los insecticidas empleados en los bioensayos de adultos fueron flonicamid, imidacloprid, tiametoxam.

2.3 Bioensayos

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

En hojas de pimiento se realizaron discos (37mm diámetro) que fueron sumergidos durante 10 segundos en la solución acuosa del insecticida a ensayar. Los discos fueron secados al aire y puestos sobre agar (1%) con el envés hacia arriba en la base de cajas de polipropileno. Las cajas son tapadas con su tapa, que estarán acondicionadas

para que puedan transpirar los pulgones y no se mueran por asfixia. Las placas son mantenidas a 25°C y fotoperiodo de 16:8 h (luz: oscuridad). La mortalidad se estimara a las 24, 48 y 72 horas para ajustar el mejor periodo para cada insecticida. Se realizaran los bioensayos con ninfas de 3-4 días (spirotretamat) y adultos ápteros (resto de insecticidas).

3. Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra la concentración letal 50 obtenida para el insecticida imidacloprid, se observa como para las cuatro poblaciones bioensayadas la llamada BS ha presentado una LC₅₀ de 37,81 ppm siendo superior al del resto de las poblaciones. Si este resultado lo comparamos con el de la bibliografía [13] donde el resultado obtenido para el mismo insecticida ha sido de 235 ppm vemos que nuestra población no presenta una resistencia significativa. Para este insecticida la población más sensible ha sido CH01 obteniendo un valor de 2,84 ppm.

En la tabla 2 se muestra los resultados obtenidos para el insecticida tiametoxam, observamos cómo hay dos poblaciones (BS y CH01) que han obtenido una concentración letal 50 superiores al del resto de poblaciones, siendo su valor de 65,04 ppm y 48,16 ppm respectivamente. Vemos que apenas hay diferencias significativas cuando se compararon los resultados con la bibliografía [13], cuyo valor obtenido ha sido de 108 ppm.

La tabla 3 muestra la concentración letal 50 para el insecticida flonicamid. En este caso la población con un valor de la resistencia más elevado ha sido AS01 obteniendo una concentración letal 50 de 12,74 ppm mientras que la población llamada CH01 ha resultado ser la más sensible para este insecticida, obteniendo un valor de LC₅₀ de 7,22 ppm. Si de nuevo hacemos una comparativa con la bibliografía [13], observamos que nuestra población AS01 es ligeramente más resistente que su población más resistente, obteniendo ello un resultado de 2,7 ppm.

4. Conclusiones

Tras la realización de los distintos bioensayos podemos obtener una estimación del estado de la resistencia a los principales insecticidas utilizados para el control de *M. persicae*. Esto junto con la información suministrada por los mecanismos de resistencia implicados, nos ayudará a entender las resistencias cruzadas y, por tanto diseñar estrategias eficaces de manejo de la resistencia.

5. Agradecimientos

Este trabajo está siendo financiado por IRAC España.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Blackman RL, Eastop VF: Aphids on the world's crops, an identification and information guide. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd; 2000.
- [2]. Devonshire AL, Field LM, Foster SP, Moores GD, Williamson MS, Blackman RL: The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1998, 353:1677-1684.
- [3]. Foster SP, Cox D, Oliphant L, Mitchinson S, Denholm I: Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). Pest Manag Sci 2008, 64:1111-1114
- [4]. Margaritopoulos JT, Skouras PJ, Nikolaidou P, Manolikaki J, Maritsa K, Tsamandani K, Kanavaki OM, Bacandritsos N, Zarpas KD, Tsitsipis JA: Insecticide resistance status of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from peach and tobacco in mainland Greece. Pest Manag Sci 2007, 63:821-829.
- [5]. Nauen R, Denholm I: Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. Arch Insect Biochem Physiol 2005, 58:200-215.
- [6]. Philippou D, Field LM, Moores GD: Metabolic enzyme(s) confer imidacloprid resistance in a clone of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) from Greece. Pest Manag Sci 2009, 66:390-395.
- [7]. Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C: Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. PLoS Genet 2010, 6:e1000999.
- [8]. Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S: Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Insect Biochem Mol Biol 2008, 38:634-644.
- [9]. Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS: A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper).

Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102:8420-8425.

[10]. Puinean AM, Denholm I, Millar NS, Nauen R, Williamson MS: Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Biochem Physiol* 2010, 97:129-132.

[11]. Wen Y, Liu Z, Bao H, Han Z: Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in China. *Pest Biochem Physiol* 2009, 94:36-42.

[12] Bass, C., Puinean, A. M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., ... & Slater, R. (2011). Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC neuroscience*, 12(1), 51.

[13] Slater, R., Paul, V. L., Andrews, M., Garbay, M., & Camblin, P. (2012). Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. *Pest management science*, 68(4), 634-638.

[14] Michela Panini, Davide Dradi, Gabriele Marani, Alda Butturini and Emanuele Mazzoni. Detecting the presence of target-site resistance to neonicotinoids and pyrethroids in Italian populations of *Myzus persicae*, 70(8), 931-938.

Tablas y Figuras

Tabla 1. LC₅₀ de poblaciones de *M. persicae* a imidacloprid.

POB	LC ₅₀	Límites (Inf-Sup)	FR
-----	------------------	-------------------	----

BS	37,81	14,94-174,6	13,2
JM03	2,86	0,99-5,38	1,0
CH01	2,84	1,04-7,84	1
AS01	4,33	0,78-18,96	1,5

POB = Poblaciones

FR= Factor de Resistencia

Tabla 2. LC₅₀ de poblaciones de *M. persicae* a tiametoxam.

POB	LC ₅₀	Límites (Inf-Sup)	FR
BS	65,04	15,47-726,03	36,31
JM03	3,918	1,51-12,32	2,18
CH01	48,16	21,09-173,64	26,89
AS01	1,79	0,82-3,52	1

POB = Poblaciones

FR= Factor de Resistencia

Tabla 3. LC₅₀ de poblaciones de *M. persicae* a flonicamid.

POB	LC ₅₀	Límites (Inf-Sup)	FR
BS	8,68	3,41-16,9	1,2
JM03	10,28	1,34-20,64	1,42
CH01	7,22	2,78-12,85	1
AS01	12,74	5,20-22,50	1,76

POB = Poblaciones

FR= Factor de Resistencia

Interaction between ABA and cytokinins in salinized tomato plants

A. Martínez-Pérez¹, G. Bahar Oztekin², A. Albacete¹, A.J. Thompson³,
M.P. Sánchez-Iglesias¹, F. Pérez-Alfocea¹ C. Martínez-Andújar¹

¹ Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain.

e-mail: amperez@cebas.csic.es

²Ege University. Faculty of Agriculture. Department of Horticulture. 35100. Bornova-Izmir. Turkey

³Cranfield Soil and Agri-Food Institute, Cranfield University, United Kingdom.

Abstract

Abscisic acid (ABA) and cytokinins (CKs) are phytohormones that mediate plant responses to abiotic stress and are mainly considered to be produced in roots. These two plant hormones have long been considered antagonists, but the role of this antagonism in mediating abiotic stress resistance remains unknown. In this study we have used reciprocal grafting of transgenic lines with altered hormone synthesis (ABA or CK synthesis) with the aim of assessing the importance of ABA and CK interaction in mediating plant salinity responses in tomato. Preliminary results have shown a negative effect in ABA and CK on tomato plant biomass under salinity. Results have also indicated that jasmonic acid (JA) might be involved in the negative impact on tomato growth caused by ABA and CK interaction under salt conditions.

Keywords: Transgenics; phytohormones; grafting; hydroponic.

1. Introduction

Salinity is a major factor limiting plant growth and crop productivity. Major effects of salt stress on plants include partial stomatal closure, nutrient imbalances, altered metabolism to divert assimilates to the roots, growth inhibition, leaf senescence and ultimately abscission. As sessile organisms, plants must sense their environment and generate systemic signals (by the tissues exposed to stress) to coordinate plant metabolic and developmental adjustments. Salinity does not only change root hormone concentration [1], but it also alters root to shoot hormone signaling [2] which affects shoot physiology. This group of hormones includes abscisic acid (ABA) and cytokinins (CKs), which are mainly considered to be produced in roots. ABA plays a role to control leaf stomatal conductance, plant growth and adaptation to water deficit and salinity, while CKs play an active role in the control of leaf growth, leaf senescence, shoot and root balance and nutritional signaling. Most studies about the role of plant hormones in stress physiology have focused on the "stress hormones" ABA and ethylene and have ignored other possible interactions. ABA and CKs have long been considered antagonists. CKs increase stomatal aperture and/or delay ABA-induced stomatal closure [3]. ABA-mediated stomatal closure decrease cytokinin transport to the shoot under salinity [4]. ABA can enhance CKs catabolism by increasing cytokinin oxidase (CKX) activity [5] [6].

Transgenics overexpressing *IPT* decreased or had no effect [7] on ABA concentrations, while the CKs status of transgenic overexpressing *NCED* have not been measured. In this work, we have used reciprocal grafting between transgenic tomato plants overproducing either ABA or CK, with the aim of determining whether ABA-CK interaction is important in mediating plant biomass under salinity.

2. Materials & Methods

Two independent sets of tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L.) either overexpressing genes encoding enzymes involved in ABA biosynthesis (*NCED*, line termed *sp12* [8]) or cytokinin biosynthesis (*IPT*, line termed *ipt*) and the respective WT (cv Ailsa Craig (AC) for *NCED* and cv UC82B (UC82) for *IPT*) were sown. Between 3 and 4 weeks after sowing (depending of germination performance of each genotype), reciprocal grafting between different transformant was performed resulting in the following 8 scion-rootstock combinations: AC/UC82, AC/*ipt*, *sp12*/*ipt*, *sp12*/*sp12*, UC82/AC, UC82/*sp12*, *ipt*/AC and *ipt*/*sp12*. One month later, when grafted plants were well established, they were transferred to a hydroponic culture by using 20 L plastic trays containing half-strength Hoagland nutrient solution. After 1 week of acclimatization in control conditions, plants seedlings were exposed to 100 mM NaCl added to the nutrient solution for 21 days. Root and

shoot fresh weights were determined in 4 replicates for each graft combination. Total leaf area was analyzed and gas exchange parameters (transpiration rate, stomatal conductance and photosynthesis) were monitored. Xylem sap was collected by applying a pneumatic pressure slightly greater (0.2 MPa) than leaf water potential using a Scholander-type pressure chamber. Leaves and xylem sap were kept at -80°C for ionic and hormonal analyses. Ionic quantification (K^+ and Na^+) in xylem sap was performed in convenient dilutions using an atomic absorption spectrophotometer and hormone concentrations (abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), the cytokinins zeatin (Z), zeatin-riboside (ZR), and isopentenyl adenine (iP)) were analyzed in the xylem sap and in the mature leaf by UHPLC-MS.

3. Results and Discussion

Results have shown that regardless the transgenic line or WT used as scion; the leaf area and total fresh weight of grafted plants with background UC82B as rootstocks were significantly higher than those with background AC. The use of transgenic, either as a rootstock or as a scion alone, did not cause any significant effect of growth. The reciprocal grafting between transgenic plants (*sp12* and *ipt*) resulted in a significant growth reduction (Figure 1).

Sp12/ipt and *ipt/sp12* graft combinations exhibited the highest ABA concentrations in leaf and xylem sap, respectively. Leaf and xylem CK concentrations were increased when AC was used as rootstock onto UC82 and when *sp12* was grafted onto UC82, in comparison with the remaining graft combinations. Interaction between *sp12* and *ipt* was not found on both leaf and xylem CK concentrations. The highest JA concentrations in xylem sap were registered in reciprocal grafting between *sp12* and *ipt* (Table 1). Furthermore, a negative correlation between xylem JA concentrations and total fresh weight ($r=-0.63$, $p<0.01$, $n=28$), and a positive between leaf JA and total fresh weight were found ($r=0.37$, $p<0.1$, $n=28$).

PCA was performed in order to gain insights about the contribution of the physiological parameters to the plant biomass-related attributes. The principal components accounted for 43.9% of the total variance. Fresh weight parameters (TFW, RFW and SFW) were explained by the main principal component (PC1), in which leaf area (LA) and JA concentrations in leaf were associated. The PCA also showed that gas

exchange parameters (transpiration rate and stomatal conductance) covaried with ABA and JA concentration in xylem sap (PC2) which accounted for 17.90 % of the total variance (Figure 2).

Previous works have indicated that selective *IPT* overexpression in roots improved the growth of tomato plants under salinity conditions [4]. Moreover, in a separate experiment, we have found a growth improvement under salinity when *sp12* is used as rootstock (data not shown). However, in this study, the use of transgenic, either as a rootstock or as a scion alone, did not cause any significant effect of growth, this may be due to the fact that different WT genetic backgrounds were used in this experiment. What remains clear in our experimental conditions is that a negative interaction between ABA and CKs seems to occur. The positive correlation found between JA concentration in leaf and SFW points out the JA involvement in the plant biomass reduction found in reciprocal *sp12* and *ipt* grafting. In line with these results, LA, TFW, SFW and RFW were associated to JA concentration in mature tomato leaf as regards the PCA. It has been described that salt tolerant tomato plants increased endogenous level of JA [9]. Moreover, Zhao et al. [10] reported that *AOC* constitutive expression, an enzyme involved in JA synthesis, induced JA contents and improved salinity tolerance in both wheat and *Arabidopsis*. These authors also provided evidence for the existence of a JA-related pathway responsible for salinity tolerance. Our study has also shown that ABA content in xylem sap was correlated with transpiration and stomatal conductance, in contrast to what was expected. Interestingly, reciprocal grafting between transgenic *sp12* and *ipt* plants registered the highest JA concentration in xylem sap, which was correlated with xylem ABA content and gas exchange parameters. In addition to the ABA-CK interaction, a cross talk between ABA and JA pathway signaling may occur in reciprocal grafting between *sp12* and *ipt* plants. Indeed, it has been suggested that there is a link between ABA and JA-mediated salinity response pathways [11].

4. Conclusions

The effects of the NCED and IPT overexpression separately reported in previous works have shown positive effects, but maybe the fact of using different genetic backgrounds in the reciprocal grafting can make these results not completely conclusive. Further research using

similar genetic backgrounds is still being necessary in order to understand the mechanisms underlying ABA and CK interaction and the possible JA involvement in this process under salinity conditions.

5. Acknowledgments

The authors thank Andrew J. Thompson, from Cranfield University (UK), and Ann C. Smigocki from Molecular Plant Pathology Laboratory (EEUU) the NCED and IPT seeds sets respectively. This work was supported by CICYT AGL2011-27996 and ROOTPOWER (REF: 289365. FP7-KBBE-2011-5 European Union).

6. References

- [1] Pérez-Alfocea F, Ghanem ME, Gómez-Cadenas A, Dodd IC (2010). Omics of root-to-shoot signaling under salt stress and water deficit. *J Integr Plant Biol.* 15:893-901.
- [2] Albacete A, Martínez-Andújar C, Ghanem ME, Acosta M, Sánchez-Bravo J, Asins MJ (2009). Rootstock-mediated changes in xylem ionic and hormonal status are correlated with delayed leaf senescence, and increased leaf area and crop productivity in salinized tomato. *Plant Cell Environ.* 32:928-38.
- [3] Ian C. Dodd (2003). Hormonal Interactions and Stomatal Responses. *J Plant Growth Regul.* 22:32–46
- [4] Ghanem ME, Albacete A, Smigocki AC, Frébort I, Pospíšilová H, Martínez-Andújar, Acosta M, Sánchez-Bravo J, Lutts S, Dodd I, Pérez-Alfocea F (2011). Root-synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J Exp Bot.* 62:125-40.
- [5] Kudoyarova GR, Vysotskaya LB, Cherkozyanova A, Dodd IC (2007). Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. *J Exp Bot.* 58:161-168.
- [6] Havlova M, Dobrev PI, Motyka V, Storchova H, Libus J, Dobra J, Malbeck J, Gaudinova H, Vankova R (2008). The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing trans-zeatin O-glucosyltransferase gene under 35S or SAG12 promoters. *Plant Cell Environ.* 31:341-353.
- [7] Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald ED (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci.* 104:19631-19636.
- [8] Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, Burbidge A, Taylor, I.B (2003). Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J.* 23:363-74.
- [9] Pedranzani H, Racagni G, Alemano S, Miersch O, Ramírez I, Peña-Cortés H, Taleisnik E, Machado-Domenech, Abdala G (2003). Hormonal Interactions and Stomatal Responses. *J Plant Growth Regul.* 41: 149–158, 2003.
- [10] Zhao Y, Dong W, Zhang N, Ai X, Wang M, Huang Z, Xiao L, Guangmin X (2014). A Wheat Allene Oxide Cyclase Gene Enhances Salinity Tolerance via Jasmonate Signaling. *Plant Physiol.* 164: 1068-1076.

Tables and Figures

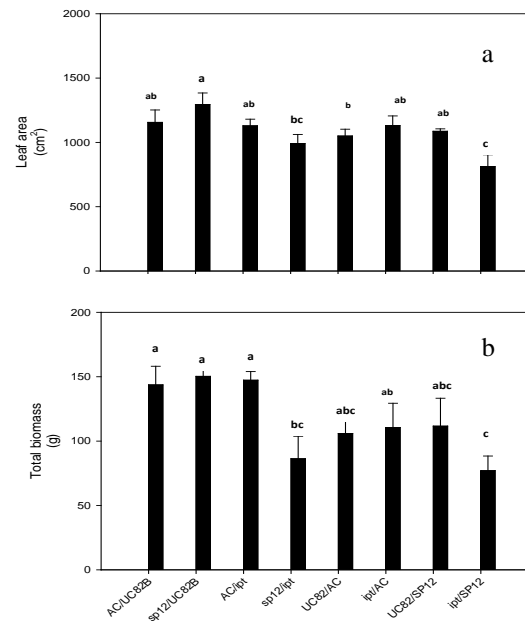
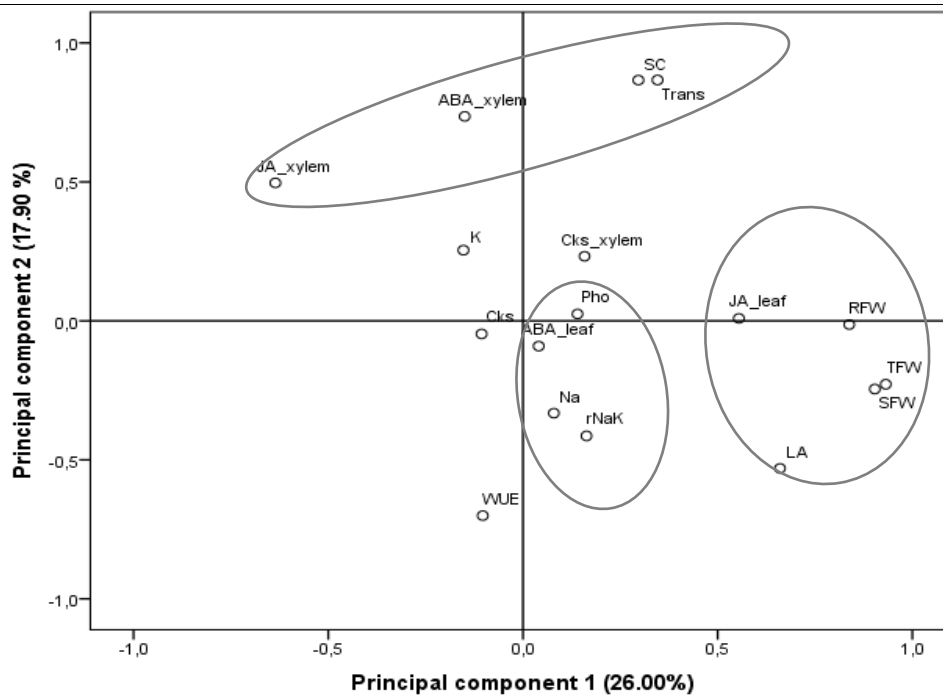


Fig. 1. Leaf area (a) and total fresh weight (b) in reciprocal grafting between UC82, AC, ipt and sp12 plants after 21 d under salinity (100 mM NaCl). Data are means of four plants. Different letters indicate that differences between grafting combinations are significant according to Tukey's test at $P < 0.05$.

Table 1. Concentrations of abscisic acid (ABA), total cytokinin (CKs; cytokinins zeatin (Z) + zeatin-riboside (ZR) + isopentenyl adenine (iP)) and jasmonic acid (JA) in the xylem sap and mature leaf of the reciprocal grafting between UC82, AC, ipt and sp12 plants after 21 d under salinity (100 mM NaCl). Data are means of four plants. Different letters indicate that differences between graft combinations are significant according to Tukey's test at P<0.05.

	ABA		CKs		JA	
	Xylem	Leaf	Xylem	Leaf	Xylem	leaf
AC/UC82	11.22 ab	50.49 ab	97.11 a	54.14 ab	110.50 bc	46.80 ab
Sp12/UC82	13.00 ab	45.05 abc	63.13 abc	46.67 bc	43.52 b	28.96 ab
AC/ipt	10.10 b	46.33 abc	69.20 abc	40.88 bc	33.57 b	72.52 a
Sp12/ipt	17.10 ab	57.43 a	53.45 bc	47.39 bc	225.21 ab	32.58 ab
UC82/AC	18.08 ab	46.68 abc	60.85 abc	31.19 c	212.63 ab	38.99 ab
ipt/AC	11.17 ab	35.34 bc	45.95 c	50.44 ab	100.39 bc	30.35 ab
UC82/sp12	21.27 ab	34.25 c	91.85 ab	66.90 a	90.56 bc	49.06 ab
ipt/sp12	23.77 a	40.75 bc	86.58 ab	45.33 bc	317.83 a	26.66 b

Fig. 2. Two principal components analysis (PCA) plot showing the separation of physiological variables along the first two principal components. The x-axis represents Principal component 1 (26.00%) and the y-axis represents Principal component 2 (17.90%).



ss and
ciated
reight;
thesis;
n; Na,

Acquired resistance by *Bemisia tabaci* to different insecticides in laboratory conditions

I. Moreno, A. Belando, P. Bielza

Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Spain. inma.moreno@upct.es

Resumen

Bemisia tabaci (Gennadius) tiene una gran capacidad para desarrollar resistencia frente a diferentes insecticidas así como resistencias cruzadas, por tanto es necesario buscar alternativas para crear estrategias de control eficaces. Para ello, es importante lograr avances en los mecanismos de resistencia a insecticidas, determinar si existen costes asociados a la resistencia y seguir estudiando las resistencias cruzadas que presentan con otras materias activas. En primer lugar, es preciso obtener poblaciones resistentes de *B. tabaci* a diferentes insecticidas. En este trabajo se han conseguido seleccionar tres poblaciones resistentes a pimetrocina (R-PIME), piridabén (R-PIRIB) y piriproxifén (R-PIX) respectivamente, cuya resistencia, ha sido adquirida en condiciones de laboratorio a partir de la población sensible de referencia (LAB-S) y siguiendo un ciclo de selección de cinco tratamientos sucesivos con dosis ascendentes. Esto es una forma de asegurarse de que la resistencia ha sido adquirida por el insecticida en cuestión, a diferencia de las poblaciones resistentes provenientes de campo cuyos antecedentes químicos se desconocen.

Palabras clave: *Bemisia tabaci*; pimetrocina; piridabén; piriproxifén.

Abstract

Bemisia tabaci (Gennadius) has a great capacity to develop resistance against insecticides as well as cross-resistance, it is therefore necessary to seek alternatives in order to create effective strategies of control. For this reason, it is important to make progress on the mechanisms of resistance to insecticides, determine if there are costs associated with resistance and keep on exploring the cross-resistance with other insecticides. In the first place, it is necessary to obtain resistant populations of *B. tabaci* to different insecticides. In this work, three populations have been selected to pymetrozine (R-PIME), pyridaben (R-PIRIB) and pyriproxifen (R-PIX)

1. Introducción

La mosca blanca del tabaco *Bemisia tabaci* (Gennadius), es una plaga polífaga que causa graves pérdidas tanto en cultivos hortícolas como en ornamentales a nivel mundial [1,2]. Debido a un uso excesivo de los insecticidas, *B. tabaci* ha desarrollado resistencia a una amplia gama de agentes de control químico. La necesidad de una mayor diversidad de productos químicos para el control de mosca blanca en los programas de manejo de la resistencia ha dado lugar a la introducción de varios insecticidas con nuevos modos de acción.

Los insecticidas reguladores del crecimiento, a pesar de tener un modo de acción único, han demostrado estar sujetos también a la resistencia por *B. tabaci*. Los cambios en la susceptibilidad a piriproxifén han sido bien documentados y, de forma similar a imidacloprid, se detectaron por primera vez en sistemas de producción intensiva, cerrados [3].

respectively, whose resistance, has been acquired in laboratory conditions from the sensitive population of reference (LAB-S), following a cycle of selection with five successive treatments with ascending doses. This is a way to make sure that the resistance has been acquired by the insecticide in question, unlike resistant populations from field whose chemical history is unknown.

Keywords: *Bemisia tabaci*; pymetrozine; pyridaben; pyriproxifen.

Piriproxifén se utilizó por primera vez en Israel en 1991, y al cabo de un año, se detectó un nivel relativamente alto de resistencia (> 500 veces) en poblaciones de *B. tabaci* recolectadas de un invernadero de rosas, donde las poblaciones habían sido expuestas a tres aplicaciones consecutivas [3].

La pimetrocina, una piridina azometina, es otro agente de control de la mosca blanca no relacionado con los neonicotinoides con un modo de acción único, altera el comportamiento de alimentación y causa la muerte de los insectos por inanición [4,5]. Su modo de acción exacto es desconocido, pero en algunas poblaciones de *B. tabaci* la resistencia a neonicotinoides se ha asociado con la resistencia a la pimetrocina debido a la sobre-expresión de un citocromo P450 monooxigenasa CYP6CM1, aparentemente capaz de detoxificar ambos tipos de insecticidas [6]. En poblaciones recogidas en invernaderos de Almería en 1994 se observaron también por

primera vez resistencias a pimetozina, a pesar de que nunca se había usado [7].

En la literatura se pueden encontrar casos en los que *B. tabaci* ha presentado resistencias a más de 45 materias activas distintas. Sin embargo, hoy por hoy no se han encontrado publicaciones sobre resistencia en poblaciones de *B. tabaci* a piridabén.

A pesar de los numerosos trabajos que existen sobre la resistencia a insecticidas en *B. tabaci*, no se conocen bien los mecanismos implicados, por lo que es difícil prever las potenciales resistencias cruzadas. Sin esa información, no se puede diseñar un programa efectivo de manejo de la resistencia, que ayude a mitigar la evolución de poblaciones resistentes.

El objetivo de este trabajo es conseguir poblaciones resistentes a diferentes insecticidas, cuya resistencia sea adquirida en laboratorio a partir de la población sensible de referencia (LAB-S). Esto es una forma de asegurarse que dicha resistencia ha sido adquirida por el insecticida en cuestión, sin tratamientos previos desconocidos como es el caso de las poblaciones provenientes de campo.

2. Materiales y Métodos

2.1 Selección de poblaciones

Para llevar a cabo el proceso de selección, en primer lugar, se han fundado tres poblaciones nuevas a partir de la población LAB-S. Una vez implantadas, se ha procedido al ciclo de selección, que consiste en cinco tratamientos sucesivos con dosis ascendentes, dejando entre ellos un tiempo suficiente para que los individuos supervivientes se multipliquen (Tabla 1).

Para cada tratamiento de selección, se prepara la dosis del insecticida respectivo con agua y mojante en un pulverizador de mano. Se trata planta limpia (material vegetal libre de enfermedades y tratamientos químicos) hasta punto de goteo, y se deja secar dentro de la cámara de gases.

A continuación se procede al vaciado de las jaulas con las poblaciones de mosca y el material vegetal en su interior. Con ayuda de un aerógrafo, se van soplando los adultos de mosca, de modo que nos quede la mayor cantidad de mosca dentro de la jaula, y podamos sacar sólo las plantas con ninfas y huevos.

Una vez que se ha secado la planta nueva tratada, se introduce en las jaulas, de manera que las

moscas que se han quedado dentro sin planta puedan exponerse al insecticida y realizar de nuevo sus puestas.

Por otra parte, las plantas con puestas que hemos sacado, se llevan a la cámara de gases y se tratan también a punto de goteo. Una vez secas se vuelven a introducir en sus jaulas.

Una vez terminado el ciclo de selección, se lleva a cabo un bioensayo completo de ninfas (6 dosis y un control) con el mismo insecticida que la población ha sido seleccionada, para determinar si se ha conseguido alcanzar o no cierto nivel de resistencia al insecticida en cuestión.

2.2 Insecticidas

Se han utilizado tres insecticidas diferentes, pimetrocina 250 g kg⁻¹ WP (Plenum 25 WP, Syngenta Agro, Madrid, España), piridabén 200 g kg⁻¹ WP (Sanmite; BASF, Sevilla, España) y piriproxi-fén 100 g L⁻¹ CE (Juvinal 10 CE; Kenogard, Barcelona, España).

2.3 Determinación del nivel de resistencia

Para medir el nivel de resistencia adquirido de las poblaciones seleccionadas se han llevado a cabo bioensayos de ninfas. Para ello, en primer lugar, se clasifican 21 plántulas de algodón de unos 20 ó 25 cm de altura, con unas 4 hojas verdaderas. A una de las hojas más jóvenes se le fija una caja-pinza sujeta mediante un palito de madera, con unas 40 hembras adultas en su interior, de manera que los individuos queden en el envés de la hoja y se mantiene durante 48 horas.

Tras este periodo de tiempo, se procede al desmontaje del bioensayo, se retiran las cajas-pinza, se recogen los individuos apoyados en el envés de las hojas y se devuelven a su población correspondiente. A cada planta se le asigna un número y se introduce en una jaula de malla anti-trips, que se mantendrá durante 12 días en condiciones de laboratorio, 25° C ± 2, 16:8 h (Luz: Oscuridad) y 60-65% HR.

Transcurrido este tiempo, suficiente para alcanzar el estadio N2, se observa cada planta en la lupa binocular, y con un rotulador permanente se van marcando las ninfas N2 hasta llegar a un máximo de 30.

Una vez marcadas todas las plantas se reparten por dosis (6 dosis más un control y 3 repeticiones para cada una) y se procede al tratamiento. Éstas se dejan secar durante 30-60 minutos y se

introducen en la jaula en la que estaban antes de ser tratadas. Se mantienen de nuevo en condiciones de laboratorio hasta el momento de la lectura del bioensayo, día 30 desde que se inició, considerando como individuos vivos las ninfas en estadio 4 y también los exuvios (el adulto ya ha emergido), e individuos muertos los huevos no eclosionados y las ninfas muertas.

2.4 Análisis de datos

Los datos se analizan utilizando el programa POLO-PC para el análisis probit [8]. Se calculan las concentraciones que causan una mortalidad del 50% (CL₅₀) y sus límites fiduciales al 95%. También se calculan los factores de resistencia a nivel de CL₅₀ (FR₅₀) como la relación entre la CL₅₀ de la población y la CL₅₀ de la población de referencia. Las dosis de campo de los insecticidas utilizadas en este estudio fueron las más altas recomendadas por el fabricante.

3. Resultados y Discusión

Los resultados del análisis probit se muestran en la tabla 2, siendo LAB-S la población susceptible de referencia de laboratorio y R-PIME, R-PIRIB Y R-PIX, las poblaciones resistentes seleccionadas a pimetrocina, piridabén y piriproxifén respectivamente.

El estudio reveló que se han conseguido tres poblaciones resistentes a pimetrocina, piridabén y piriproxifén respectivamente, como bien indica el FR, >18,9, 212,5, >47,9, de cada una de ellas, en comparación con la población LAB-S.

La población seleccionada con pimetrocina presentó un valor de CL₅₀ >6000 ppm, con un factor de resistencia (FR) de 18,9. En la literatura, al igual que pasa con otros insecticidas, todos los datos publicados son en estudios realizados sobre adultos de mosca blanca. Se han encontrado datos en ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* (mosca blanca de los invernaderos) [9], que al ser una mosca blanca cabe esperar que los mecanismos de resistencia sean similares, pudiendo comparar ambos resultados. El rango de valores de la CL₅₀ para *T. vaporariorum* fue de 78 a 213 mg L⁻¹.

Respecto a nuestra población seleccionada a piridabén, se obtuvo una CL₅₀ de 72,25 ppm con un alto nivel de resistencia, obteniendo un valor de FR de 212,5 frente a la población LAB-S. Por tanto, se puede decir que se ha conseguido una población muy resistente a este insecticida con

un proceso de selección muy eficiente. Por otra parte, cabe señalar que hay una completa falta de estudios previos en la literatura sobre su resistencia en *B. tabaci*, aunque se conoce una alta susceptibilidad a piridabén de poblaciones de *B. tabaci* en el sureste de España.

Finalmente, para la población seleccionada a piriproxifén, R-PIX, se obtuvo un valor de la CL₅₀ mayor de 1000 ppm con un FR >47,9. Por tanto cabe destacar que nuestra población obtuvo el valor más alto en comparación con la bibliografía [10,11,12]. En consecuencia, se puede decir que es una población notablemente seleccionada y muy resistente a dicho insecticida. Aunque los niveles de resistencia a piriproxifén se han publicado en poblaciones de campo de biotipos B y Q de *B. tabaci* de diversas áreas del mundo [10], la resistencia a piriproxifén en poblaciones españolas biotipo Q no ha sido documentada previamente. Horowitz et al. [3] demostraron una relación empírica entre la resistencia a piriproxifén y la presencia del biotipo Q. De manera similar, el biotipo Q fue vinculado con una alta resistencia y resistencia cruzada a los neonicotinoides. En las zonas donde múltiples biotipos coexisten, aplicaciones de piriproxifén y/o neonicotinoides pueden ser capaces de seleccionar el biotipo Q debido a su mayor resistencia a insecticidas [10].

4. Conclusiones

Se han conseguido tres poblaciones resistentes, R-PIME, R-PIRIB y R-PIX, a pimetrocina, piridabén y piriproxifén respectivamente, a partir de la población sensible de referencia de laboratorio (LAB-S). A partir de estas poblaciones resistentes se podrá llegar a conocer los mecanismos implicados en la resistencia en *B. tabaci*, el coste ecológico que conllevan y las resistencias cruzadas que presentan con otras materias activas. Todo ello nos ayudará a diseñar estrategias eficaces de manejo de la resistencia.

5. Agradecimientos

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

6. Referencias bibliográficas

[1] Brown J K, Frohlich D R, Rosell R C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies-biotypes of

Bemisia tabaci or a species complex. Annu Rev Entomol. 40, 511-534.

[2] Oliveira M R V, Henneberry T J, Anderson P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. Crop Prot. 20, 709-723.

[3] Horowitz, A.R., Ishaaya, I., 1994. Managing resistance to insect growth regulators in the sweetpotato whitefly (Homoptera: aleyrodidae). J. Econ. Entomol. 87: 866-871.

[4] Harrewijn P, Kayser H. 1997. Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. In-situ studies with electronic monitoring of feeding behaviour. Pestic Sci- 49: 130-140.

[5] Peric P, Marcic D. 2007. Pymetrozine: a biorational insecticide for aphid and whitefly control. Biljni Lekar (Plant Doctor), 35: 583-588.

[6] Gorman K, Slater R, Blande J, Clarke A, Wren J, McCaffery A, Denholm I 2010. Cross-resistance relationships between neonicotinoids and pymetrozine in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Pest Manage Sci. 66: 1186-1190.

[7] Elbert A., Nauen R., 2000. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. Pest Manage Sci. 56: 60-64.

[8] Russell RM, Robertson JL and Savin NE 1977. POLO – a new computer program for probit analysis. Bull Entomol Soc Am 23: 209–213.

[9] Karatolos, N.; Denholm, I.; Williamson, M.; Nauen, R. 2010. Incidence and characterisation of resistance to neonicotinoid insecticides and pymetrozine in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae) Pest Manage Sci; 66: 1304–1307.

[10] Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V and Ishaaya I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. Arch Insect Biochem Physiol 58: 216–225.

[11] Toscano NC, Prabhaker N, Castle SJ and Henneberry TJ 2001. Inter-regional differences in baseline toxicity of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) to the two insect

growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen. J Econ Entomol 94:1538–1546.

[12] Ma DY, Gorman K, Devine G, Luo WC and Denholm I 2007. The biotype and insecticide-resistance status of whiteflies, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), invading cropping systems in Xinjiang Uygur Autonomous Region, northwestern China. Crop Prot 26:612–617.

Tablas

Tabla 1. Tratamientos a las que se sometieron las poblaciones seleccionadas.

Selección	Tratamiento	Ppm
R-PIME	15/04/2014	1000
	22/07/2014	3000
	15/10/2014	4800
	04/12/2014	9600
	06/03/2015	9600
R-PIRIB	15/07/2013	6
	16/11/2013	13
	06/02/2014	25
	07/06/2014	50
	07/12/2014	50
R-PIX	03/02/2014	80
	04/05/2014	160
	01/08/2014	360
	11/12/2014	640
	18/02/2015	1280

Tabla 2. Toxicidad de las poblaciones seleccionadas de *B. tabaci* a diferentes insecticidas.

Insecticida	Poblaci.	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) (95% LC)	FR ₅₀
Pimetrocina	LAB-S	317,09 (148,22-608,45)	
	R-PIME	>6000	>18,9
Piridabén	LAB-S	0,34 (0,21-0,51)	
	R-PIRIB	72,25 (35,6-178,36)	212,5
Piriproxifén	LAB-S	20,86 (13,77-30,37)	
	R-PIX	>1000	>47,9

Preliminary study of the palliative effect that offers grafting in plants of sweet pepper against to water stress

A. Gálvez López, J. López-Marín

Hortofruticultura, IMIDA (Instituto Murciano de I+D Agrario y Alimentario). C/ Mayor s/n La Alberca.30150 (Murcia), España. (www.imida.es). E-mail: 1297@coitarm.es

Resumen

En la zona del campo de Cartagena y sur de Alicante, el cultivo se realiza desde diciembre hasta agosto, centrándose la producción en los meses donde se dan altas temperaturas y radiaciones en el interior de los invernaderos, por lo que el cultivo tiene una gran demanda de agua. El objetivo de este estudio fue estudiar el efecto paliativo que ejerce el injerto sobre el estrés hídrico. Se utilizaron plantas de la variedad Gacela y Gacela injertada sobre sí misma. En general, el uso del injerto mejoró los parámetros vegetativos y los fotosintéticos e incrementó el rendimiento de las plantas injertadas en relación a las que no se injertaron. Estos resultados sugieren que las plantas injertadas han mostrado un incremento en la absorción de agua y nutrientes y tolerancia a este estrés abiótico, por lo que podemos concluir que el injerto es una eficaz herramienta agrícola que mejora los parámetros vegetativos y de producción frente a un estrés hídrico.

Palabras clave: Invernadero; temperatura; riego; estrés abiótico.

Abstract

In the area of the Campo de Cartagena and South of Alicante, the crop is done from December until August, focusing production in the months where high temperatures and radiation are given inside the greenhouses, so the crop has a high demand for water. The aim of this study was to study the palliative effect that exercises the graft on the water stress. Plants of the variety were in use Gacela and Gacela grafted on itself. In general, the use of the graft improved the vegetative parameters and the photosynthetic ones and increased the yield of the plants grafted on relation to which they are not grafted. These results suggest that the grafted plants have showed an increase in the absorption of water and nutrients and tolerance to this abiotic stress, for what we can conclude that grafting is an effective agricultural implement that improves the vegetative parameters and of production against to a water stress.

Keywords: Greenhouse; temperature; irrigation; abiotic stress.

1. Introducción

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos más importantes en el mundo y se encuentra entre los más susceptibles a estrés hídrico debido a que tiene una gran superficie foliar de transpiración, una alta conductancia estomática y un sistema radicular poco profundo [1]. El área mediterránea es una importante región para la producción de pimientos frescos. Sin embargo, este área tiene un serio problema de sequía, el cual no solo limita la posibilidad de cultivar nuevas tierras sino también del mantenimiento de una alta producción en las existentes. La baja disponibilidad de agua en el suelo provoca el estrés abiótico de mayor incidencia en el crecimiento vegetal, que, en los sistemas agrícolas representan grandes pérdidas económicas. Las pérdidas de cosecha debidas al estrés hídrico probablemente exceden a las provocadas por la combinación del resto de estreses [2]. Las plantas experimentan estrés

hídrico cuando el suministro de agua a las raíces es limitado o cuando la tasa de transpiración es muy alta. Estas dos condiciones coinciden bajo climas áridos y semiáridos [3]. Por todo ello, la sequía tiene un profundo impacto en la agricultura y en los sistemas ecológicos, de ahí que la capacidad de las plantas para soportar este estrés sea de gran importancia desde el punto de vista económico [4]. Por lo tanto, la necesidad de nuevas alternativas para una agricultura sostenible, como plantas más tolerantes a la sequía, proporcionaría una solución práctica para aliviar el problema de la limitación de agua [5]. La gestión del agua en el cultivo de pimiento es extremadamente importante en todas las etapas del desarrollo de la planta, debido a su influencia en el establecimiento de soporte, problemas fúngicos, cuajado y calidad [6]. El injerto puede ser una estrategia de adaptación en sistemas agrícolas de producción orgánica o integrada que permite a las plantas inducir la resistencia o

tolerancia a enfermedades transmitidas por patógenos del suelo y estreses ambientales [7]. El cultivo de plantas injertadas se ha extendido ampliamente (principalmente en tomate, melón y sandía), pero esta práctica está aún limitada en pimiento [8] y en lo que respecta a la información existente sobre patrones de pimiento tolerantes a estrés hídrico. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto paliativo que ejerce el injerto sobre el estrés hídrico.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal y condiciones del invernadero

Se utilizaron plantas de la variedad de pimiento Gacela F1 (Syngenta Seeds, Holanda) y Gacela injertada sobre sí misma. Las plantas se injertaron mediante el método japonés [9]. Se trasplantaron el 11 de diciembre de 2013 en un invernadero de 240 m² de superficie, localizado en la finca experimental "Torreblanca" del IMIDA en Murcia, SE España (lat. 37° 45' N, long. 0°59' W). El suelo se biosolarizó durante 90 días en verano de 2012, añadiendo una mezcla de 5 Kg/m² de estiércol de oveja y gallina (2:1, w/w). La densidad de plantación fue de 2,5 plantas/m². El ensayo en campo se llevó a cabo siguiendo las prácticas culturales habituales usadas por los productores de pimiento de esta zona. El ciclo de cultivo finalizó el 12 Agosto de 2014.

Los tratamientos de riego utilizados fueron: T1: (100% ETC, Control), T2: (75 % Control) y T3: (50% Control). La temperatura ambiente se midió mediante un Hobo U12 Temperature data logger (Onset, Massachusetts, USA).

2.2 Desarrollo vegetativo

Se utilizaron 15 plantas injertadas y sin injertar de cada tratamiento hídrico para medir los diferentes parámetros. Altura de la planta, número de hojas, área foliar, y biomasa foliar. El área foliar se midió usando un medidor de área foliar (LICOR-3100C; LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). El peso seco se determinó por secado en estufa a 65 °C hasta peso constante.

2.3 Intercambio de gases

El intercambio de gases se midió en hojas totalmente desarrolladas. La medida se realizó a los 197 DDT (días después del trasplante), desde las 9:00 am hasta las 11:00 am (GMT). La tasa fotosintética (Amax, $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$), conductancia estomática (gs, $\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2\text{s}$), transpiración (E, $\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2\text{s}$), CO_2

intercelular (Ci, $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol aire}$) y uso eficiente del agua (WUE, $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$) se midieron en condiciones constantes de saturación de luz (800 $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$) y 400 ppm de CO_2 con un medidor de fotosíntesis portátil LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA).

2.4 Producción y calidad

Se recolectaron los frutos de las 15 plantas controladas. La calidad de la producción comercial se evaluó de acuerdo a las prácticas comerciales, descartándose los frutos con desordenes fisiológicos (soleados, blossom-end-rot, etc.) que no eran comerciales. 20 frutos aleatoriamente (4 por réplica del material vegetal) se seleccionaron a los 230 DDT para medir la calidad de la fruta. Los fenoles totales se determinaron mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando el ácido gálico como material de referencia según metodología [10]. Los contenidos en licopeno y β -caroteno se determinaron según Nagata y Yamashita 1992 [11]. El contenido en sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) se determinó usando un refractómetro (Reichert Analytical Instrument, Depew, New York, USA).

2.5 Diseño del experimento y análisis estadístico

Plantas injertadas y sin injertar crecieron en una unidad modular de invernadero. El diseño experimental fue en bloques al azar. Cada tratamiento (material vegetal) tenía tres bloques y 5 plantas cada uno. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics calculando las diferencias significativas por ANOVA y los resultados fueron comparados con una probabilidad de $P \leq 0.05$ de acuerdo al test LSD.

3. Resultados y Discusión

Las plantas injertadas son las que presentaron mayores valores de área foliar en todos los tratamientos de riego. En relación con el número de hojas, en el tratamiento de estrés hídrico (T3) es donde se obtuvieron menores valores y se observa que en este tratamiento las plantas injertadas redujeron el número de hojas solo un 33% como promedio frente a un 38% en el caso de las plantas sin injertar. El índice de área foliar también presentó valores más altos en las plantas injertadas con respecto a las que no se injertan en todos los tratamientos de riego, y se alcanzó el valor mayor en T2. Con respecto a la biomasa foliar, las plantas injertadas presentaron mayores valores que las sin injertar, excepto en el tratamiento de riego (T2) y se observó que en

el tratamiento más estresado las plantas injertadas disminuyeron la biomasa foliar solo un 12% como promedio frente a un 16% en las sin injertar.

Se registraron los mayores valores para la mayoría de los parámetros fotosintéticos en las plantas injertadas para todos los tratamientos de riego en la relación con las no injertadas, lo que indicó un mejor comportamiento de las mismas frente a la escasez de agua. Con relación a la fotosíntesis, en las plantas injertadas se obtuvieron los valores más altos. Las plantas no injertadas la redujeron en el tratamiento de estrés más severo un 56% con respecto al riego control, frente a un 35% solamente en el caso de las injertadas. Para la conductancia estomática también se obtuvieron los mayores valores en las plantas injertadas aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de riego y las plantas injertadas y no injertadas. En cuanto a la [CO₂] intercelular, no se encontraron diferencias entre las plantas injertadas y las sin injertar. Los mayores valores de transpiración se encontraron en las plantas injertadas, excepto para el tratamiento de estrés (T2) y obteniéndose como promedio en el tratamiento más estresado (T3) un 57% más de transpiración que en las plantas no injertadas. En referencia al uso eficiente del agua, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas sin injertar y las injertadas aunque en estas últimas se obtuvieron los mayores valores, lo cual indica que las plantas injertadas tienen una mejor adaptación a las condiciones de estrés. Entre los distintos tratamientos de riego se encontraron diferencias significativas, siendo en el tratamiento más estresado (T3) donde se realizó un uso más eficiente del agua.

Con relación a la producción, tanto para la total como para la comercial, se obtuvieron los mayores valores en las plantas injertadas y se redujeron en un 37% y un 56% como promedio ambas producciones en el tratamiento de estrés hídrico (T3) con respecto al tratamiento control (T1). En las plantas no injertadas, las reducciones en este tratamiento de estrés hídrico (T3) fueron como promedio del 41% y del 53% con respecto al control (T1). Estos resultados fueron confirmados por [12] en sandías mini injertadas sobre un patrón comercial, en las cuales se obtuvo un 60% más de la producción comercial cuando crecían bajo condiciones de déficit hídrico comparadas con sandías no injertadas.

En cuanto a los parámetros de calidad, no se encontraron diferencias para los fenoles totales entre las plantas injertadas y las no injertadas, ni entre los distintos tratamientos de riego excepto

para el tratamiento de riego control en el que el valor es mayor en las no injertadas. Con respecto al licopeno, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de riego ni para las plantas no injertadas ni para las injertadas. En relación al β -caroteno, los mayores valores se obtuvieron en las plantas sin injertar. Con relación a los °Brix, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas injertadas y las control, pero sí en cambio entre los distintos tratamientos de riego, obteniéndose en el tratamiento más estresado (T3) los mayores contenidos.

4. Conclusiones

En general, el uso del injerto, mejoró los parámetros vegetativos y fotosintéticos e incrementó el rendimiento de las plantas injertadas en relación a las que no se injertaron, por lo que podemos concluir, que el injerto es una eficaz herramienta agrícola que mejora los parámetros vegetativos y de producción frente a un estrés hídrico.

5. Agradecimientos

A los proyectos PO 07-4 y PO 07-41 de la Unión Europea-Feder 80% PO Región de Murcia.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Delfine S., Tognetti R., Loreto F., Alvino A. 2002. Physiological and growth responses to water stress in field-grown bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Hort Sci Biotech.* 77: 697–704.
- [2] Reddy AR., Chaitanya KV., Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol.* 161: 1189–1202.
- [3] Chaves M.M., Maroco, J.P., Pereira J.S. 2003. Understanding plant response to drought from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol.* 30: 239-264.
- [4] Shao HB., Chu L., Jaleel CA., Zhao CX. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C R Biol.* 331: 215-225.
- [5] Xoconostle-Cázares, B., Ramírez-Ortega, F.A., Flores-Elenes, L., Ruiz-Medrano, R. 2010. Drought tolerance in crop plants. *Am J Plant Physiol.* 5:241-256.
- [6] Sezen S.M., Yazar A., Eker S. 2006. Effect of drip irrigation regimes on yield and quality of field grown bell pepper. *Agr Water Manage.* 81:115–131.
- [7] San Bautista A., Calatayud A., Nebauer S.G., Pascual B., Maroto J.V., López-Galarza S. 2011. Effects of simple and double grafting melon

plants on mineral absorption, photosynthesis, biomass and yield. *Sci Hort.* 130: 575–580.

[8] Miguel A., De la Torre F., Baixauli C., Maroto J.V., Jordá M.C., López M.M., García-Jiménez J. 2007. Injerto en hortalizas. [Graft in vegetables.] Valencia, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación and Fundación Ruralcaja.

[9] Suzuki, E. 1972. "Sandía de Yamato".

[10] Kähkönen, M.P., Hopia, A.I.; Vucrela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, T.S.; Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agr Food Chem.* 1999. 47: 3954–3962.

[11] Nagata, M. and Yamashita, I.: 1992: Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish:* 39(10): 925–928.

[12] Roupael, Y., Cardarelli, M., Colla, G., Rea, E. 2008. Yield, mineral composition, water relations, and water use efficiency of grafted mini-watermelon plants under deficit irrigation. *Hortscience.* 43 (3): 730–736.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Parámetros vegetativos.

Parámetros	T	T1	T2	T3
Altura (cm)	G	142,00 aA	140,33 aA	126,33 aA
	G-G	140,67 aA	142,67 aA	133,33 aA
Á. Foliar (cm ²)	G	22361,52 aA	22276,19 aA	15831,14 aA
	G-G	23731,97 aB	24853,66 aB	158959,09
Nº Hojas	G	677,77 aB	620,67 aB	433,33 aA
	G-G	620,33 aB	588,00 aAB	415,00 aB
Índice de área foliar	G	55903,81 aA	55690,48 aA	39577,84 aA
	G-G	59329,93 aB	62134,14 aB	39897,73 aA
Biomasa foliar (g)	G	7,48 aA	8,19 aA	6,29 aA
	G-G	7,89 aB	7,51 aAB	6,91 aA

G: Gacela; G-G: Gacela-Gacela; Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre plantas injertadas y sin injertas y las mayúsculas entre tratamientos riego (Test LSD, P<0,05).

Tabla 2. Parámetros fotosintéticos.

Parámetros	T	T1	T2	T3
A (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	G	18,71 aC	14,92 aB	8,47 aA
	G-G	21,49 aC	16,94 bB	13,97 bA
g _s (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	G	0,61 aC	0,28 aB	0,09 aA
	G-G	0,74 bC	0,37 aB	0,18 bA
Ci (µmol CO ₂ mol ⁻¹)	G	281,11 aB	246,77 aB	188,26 aA
	G-G	278,72 aB	258,96 aB	208,40 aA
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	G	13,15 aC	8,99 aB	3,93 aA
	G-G	14,23 bC	8,93 aB	6,13 bA
Uso eficiente del agua (WUE)	G	1,42 aA	1,69 aA	2,14 aB
	G-G	1,51 aA	1,96 aB	2,28 aB

G: Gacela; G-G: Gacela-Gacela; Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre plantas injertadas y sin injertas y las mayúsculas entre tratamientos riego (Test LSD, P<0,05).

Tabla 3. Producción y calidad.

Parámetros	T	T1	T2	T3
Prod. total (Kg plant ⁻¹)	G	4,73 aC	3,71 aB	2,77 aA
	G-G	4,88 bC	4,11 bB	3,04 bA
Prod. comercial (Kg plant ⁻¹)	G	3,53 aC	2,49 aB	1,65 aA
	G-G	4,12 bC	3,21 bB	1,81 bA
Fenoles totales (mg/ g PF)	G	0,91 bA	1,06 aAB	1,21 aB
	G-G	0,77 aA	1,15 aB	1,21 aB
Licopeno (mg/ g PF)	G	0,32 aA	0,31 aA	0,31 aA
	G-G	0,19 aA	0,23 aA	0,28 aA
β-caroteno (mg/ g PF)	G	0,44 bA	0,49 aA	0,48 aA
	G-G	0,34 aA	0,41 aA	0,44 aA
*Brix	G	7,40 aA	8,17 aAB	8,50 aB
	G-G	7,27 aA	7,37 aA	9,07 aB

G: Gacela; G-G: Gacela-Gacela; Letras diferentes indican diferencias significativas, las minúsculas entre plantas injertadas y sin injertas y las mayúsculas entre tratamientos riego (Test LSD, P<0,05).

Towards a more sustainable fertilization: combined use of compost and inorganic fertilization for tomato cultivation

C. Chocano, T. Hernández

CEBAS. CSIC. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. Apartado 164. 30.100, Espinardo, Murcia. cchocano@cebas.csic.es

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es evaluar la viabilidad del uso combinado de fertilizantes orgánicos e inorgánicos como alternativa a la fertilización inorgánica convencional en el cultivo de tomate. Para ello se utilizaron dos compost diferentes (compost de una mezcla de estiércol de vaca+alperujo+poda de olivo y compost de estiércol de oveja y cabra) añadidos al suelo, solos o con fertilización inorgánica en un cultivo de tomate en invernadero. Se ha usado como referencia una fertilización convencional inorgánica. Cuando se ha utilizado solo, el fertilizante orgánico consigue concentraciones más bajas de N en hojas y frutos que con la fertilización convencional inorgánica. El uso combinado de compost y fertilizante inorgánico, sin embargo, produce mayores rendimientos y mejor calidad del fruto que en los suelos sometidos a sus respectivos tratamientos inorgánicos cuando se usan solos. Además, los suelos con fertilización combinada muestran valores más altos de C de la biomasa microbiana, respiración basal y actividad deshidrogenasa que sus respectivos tratamientos inorgánicos. El uso combinado de compost y fertilizante inorgánico hace posible la reducción de la fertilización inorgánica alrededor de un 40% mientras se obtiene similar cantidad y calidad de la fruta además de mejorar las características del suelo.

Palabras clave: compost alperujo; C de la biomasa microbiana; calidad del suelo, ahorro de fertilizantes inorgánicos

Abstract

The use of organic wastes (OW) as alternative to inorganic fertilizers is very convenient since they slowly release significant amounts of nutrients, improve soil physical and microbiological properties and reduce soil borne diseases without the use of chemical control. In this work, tomato was cultivated in greenhouse under different fertilization treatments: organic+mineral fertilization, mineral and only organic, in order to evaluate the effect of two OW on crop yield and soil quality in comparison with the use of traditional inorganic fertilization. One compost from sheep and goat manure (R1) and other from a mixture of manure+alperujo+olive pruning (R2) were added to a loamy soil from SE Spain either, alone or in combination with 25% or 50% of a Hoagland solution (MF), which was also used alone (100%) as traditional mineral fertilization for greenhouse tomato cultivation. Both, R1 and R2 gave lower yields than inorganic fertilization when applied alone. However, R1+50% MF gave the highest yields, followed by 100% MF and R2+50% MF. Tomato yield obtained with 50% and 25% MF used alone improved with the addition of both composts indicating a beneficial effect of the organic amendments on plant growth. Soil microbiological quality, reflected by microbial biomass C, soil respiration and dehydrogenase activity was also improved by composts

Keywords: alperujo compost; microbial biomass C; soil quality; saving inorganic fertilizers

1. Introducción

El cultivo intensivo y la falta de implementación de prácticas efectivas de conservación del suelo han llevado a su degradación y a la disminución de la productividad debido a la excesiva erosión del suelo, la pérdida de nutrientes por lixiviación y una disminución de la materia orgánica estable del suelo. Se deben hacer esfuerzos para detener la caída de la productividad del suelo y para restaurarla en los suelos degradados en el menor tiempo posible. Esto podría lograrse a través de la adecuada gestión y reciclaje de residuos orgánicos. Su uso eficiente y efectivo

como acondicionadores del suelo y fertilizantes constituye uno de los mejores medios para mantener y restaurar la calidad y productividad del suelo [1,2].

El manejo de la materia orgánica del suelo utilizando residuos orgánicos compostados es la llave de la agricultura sostenible [3]. Además de su capacidad de liberar lentamente los nutrientes [4,5], la materia orgánica es en gran parte responsable de la agregación, así como de la mejora de las distintas propiedades físicas del suelo, incluyendo la capacidad de retención hídrica.

Sin embargo, la aplicación de residuos orgánicos como un sustituto para la fertilización mineral convencional es a veces problemático porque algunos cultivos tienen altas necesidades de nutrientes o necesidades puntuales a lo largo de su ciclo de crecimiento; sobre todo algunas hortalizas.

Combinar la aplicación de enmiendas orgánicas y fertilizantes inorgánicos con N mineral con el objetivo de satisfacer las necesidades de N del cultivo puede ser una alternativa adecuada para la sustitución de fertilizantes minerales convencionales. El uso de residuos orgánicos tratados como fertilizantes y enmiendas del suelo no sólo trae beneficios económicos para el pequeño agricultor, sino que también reduce la contaminación debido a la reducción de la escorrentía de nutrientes y N por lixiviación [3].

El objetivo de este estudio es evaluar la viabilidad del uso combinado de fertilizantes orgánicos e inorgánicos como una alternativa a la fertilización inorgánica convencional en el cultivo de tomate.

2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

El ensayo se ha realizado en un invernadero en una finca de investigación en Santomera (Murcia) en macetones de 40 kg de suelo franco arenoso con 3 plantas de tomate/maceta y riego por goteo. El cultivo se ha realizado desde principios de junio hasta principios de octubre de 2014. Se controló la temperatura del invernadero entre 19 y 29°C y se utilizó tomate redondo en rama variedad "Optima".

2.2 Diseño experimental y tratamientos

Se han utilizado dos residuos orgánicos compostados. R1: compost de estiércol de oveja y cabra, en dosis de 50,5 t/ha de compost fresco (3,4 g N/planta) con una relación C/N 12 y R2: compost de alperujo, estiércol y poda de olivo, en dosis de 40 t/ha de compost fresco (3,4 g N/planta) con una relación C/N de 16.

Para la fertilización inorgánica se ha empleado una disolución Hoagland salina (ppm N:224; K:223; Ca: 160; P: 62; S: 32; Mg:24; Mn: 0.11; Fe: 0.12; Zn: 0.13) utilizada en el cultivo convencional del tomate.

Se han ensayado 9 tratamientos distribuidos al azar y en 4 bloques (por cuadruplicado). 3 con fertilización inorgánica con disolución Hoagland: H100 (al 100%); H60 (60%) y H20 (20%). 2 con

fertilización orgánica: R1 y R2 y 4 tratamientos con fertilización combinada: R1 + H60, R1 + H20, R2 + H60 y R2 + H20.

2.3 Parámetros analizados

A partir de los 91 días del trasplante comenzó la recolección de los frutos rojos y maduros a los que se analizaron los siguientes parámetros: peso y calibre del fruto, nº frutos/planta y kg/planta. Periódicamente se tomaron muestras representativas de frutos analizando: firmeza, °Brix. Al zumo correspondiente: % jugo, % materia seca, pH, CE, acidez titulable del jugo y a la materia seca: macro, micronutrientes y metales pesados.

Al final del cultivo se tomaron muestras foliares de la planta y se analizó el contenido de elementos totales; así como muestras de suelo (también analizadas al inicio del cultivo) en las que se determinaron los contenidos de macro y micronutrientes y parámetros indicadores de la actividad microbiana del suelo: C de la biomasa microbiana, respiración basal y actividad deshidrogenasa.

Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS Anova de una vía. Test Tukey ($p < 0.05$).

3. Resultados y Discusión

Los valores obtenidos en cosecha (kg/planta) nos indican un mayor rendimiento en el tratamiento combinado R1+H60 (Tabla. 1), aunque sin diferencias significativas con los tratamientos H100 y R2+H60 (Fig. 1). Las producciones más bajas corresponden a la fertilización orgánica única. Cuando los suelos enmendados con compost son tratados con H60 (R1+H60 y R2+H60) los rendimientos del tomate se incrementan con respecto al uso de fertilización inorgánica sola (H60) un 39% y un 21% con R1 y R2 respectivamente [6].

Para los suelos tratados de forma inorgánica, la curva resultante de la representación gráfica de la cantidad de N añadida por la planta (y) vs rendimiento tomate por planta (x) se ajusta a una curva potencial $y = 0.109 X^{2.544}$ ($R^2 = 0.9707$) (Fig. 2). Aplicando esta ecuación a los rendimientos obtenidos en los suelos tratados con compost, la cantidad teórica de N disponible para las plantas de tomate en estos tratamientos es de 0.204 g de N por planta con R1 y 0.019 g de N con R2. Esto nos da una idea de la lenta mineralización del N en los compost a lo largo del cultivo y que resulta insuficiente

para las exigencias del tomate [7]. La relación C/N también nos da una idea de la velocidad de mineralización. El compost R1 (C/N 12) obtiene mejores resultados que el R2 (C/N 16) donde hay más C de carácter lignocelulósico que ralentiza el proceso de mineralización del N.

El número de frutos por planta sigue un patrón similar al del rendimiento (Tabla. 2), para un mismo tipo de fertilización inorgánica, el mayor número de frutos por planta se obtiene cuando la fertilización inorgánica se combina con la adición de compost, independientemente del tipo de compost usado. Los frutos de todos los tratamientos presentan un tamaño y forma similar.

La firmeza del fruto, medida como la capacidad del fruto para soportar la presión de aplastamiento, permite frutas más resistentes al impacto mecánico y así tener una vida útil más larga. Los tomates de los tratamientos H100, R1+H60, R2+H60 y R1+H20 muestran mayores valores de firmeza que el resto de los tratamientos, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Los frutos de los tratamientos de fertilización combinada (R1+H60, R2+H60, R1+H20 y R2+H20) mostraron valores ligeramente mayores de sólidos solubles totales (TSS), acidez titulable (TA) y relación TA/TSS que los frutos de sus respectivos tratamientos de fertilización inorgánica (H60 y H20), aunque sin diferencias estadísticas.

En cuanto a las propiedades del suelo, el valor del C de la biomasa microbiana (Fig. 3) nos da idea del tamaño de la población microbiana. Los valores más bajos se obtienen con los tratamientos inorgánicos, mientras que la adición de compost al suelo provoca un aumento de los microorganismos, sobre todo con los aportes combinados de compost y H60.

Para medir la actividad de esa población microbiana analizamos parámetros como deshidrogenasa (Fig. 4) y respiración basal (Fig. 5). Ambos indicadores muestran valores más altos con la fertilización combinada R+H60 lo que implica una estimulación de los microorganismos fomentada por la materia orgánica aportada y la disponibilidad de N [8].

4. Conclusiones

El compost en solitario, a las dosis empleadas en este ensayo, no suponen un incremento en la

producción del tomate debido a la lenta mineralización de su materia orgánica y la posible inmovilización de los nutrientes, especialmente el N.

La combinación del compost con el 60% de la fertilización inorgánica obtiene similares rendimientos y calidad del fruto que la fertilización mineral convencional con las ventajas de reducir un 40% el fertilizante inorgánico y así disminuir el riesgo de lixiviación y contaminación por N; de mejorar las propiedades microbiológicas del suelo y el contenido en materia orgánica, reutilizando los residuos orgánicos.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado dentro del Proyecto Life ref LIFE 10ENV/GR/594 WASTE REUSE, financiado por la Unión Europea.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Passarini, K.C., Pereira, M.A., Farias, T.M.D., Calarge, F.A., Santana, C.C., 2014. Assessment of the viability and sustainability of an integrated waste management system for the city of Campinas (Brazil), by mean of ecological cost accounting. *J. Clean. Prod.* 65, 479-488
- [2] Kumar, R., Sharma, S., Prasad, R., 2014. Yield nutrient uptake and quality of Stevia as affected by organic sources of nutrient. *Comm. Soil Sci. Plant Nutr.* 21, 3137-3149
- [3] Nyamangara, J., Bergstrom, L.F., Piha, M.I., Giller, K.E., 2003. Fertilizer use efficiency and Nitrate Leaching in a Tropical Sandy Soil. *J. Environ. Qual* 32, 599-606
- [4] Eghball, B., 2000. Nitrogen mineralization from field-applied beef cattle feedlot manure or compost. *Soil Sci Soc Am J* 64, 2024-2030
- [5] Choi, B., Lim, J.E., Sung, J.K., Jeon, W.T., Lee, S.S., Oh, S.E., Yang, J.E., Ok, Y.S., 2014. Effect of rapessed green manure amendment on soil properties and rice productivity. *Comm. Soil Sci. Plant Nutr.* 45, 751-764
- [6] Mueller, S., Wamserm, A.F., Suzuki, A., Becker, W.F., 2013. Productividade de tomate sob adubação orgânica e complementação com adubos minerais. *Hortic. Bras.* 31, 86-92
- [7] Ferreira, S.M.M., Ferreira, B.F., Fontes, P.C.R., Dantas, J.P., 2006. Qualidade de tomate em função das doses de nitrogênio e da adubação orgânica em duas estações. *Hortic. Bras.* 24, 141-145
- [8] Kalid, I., Nadeem, A., Ahmed, R., Husnain A., 2014. Conjunctive and mineralization impact of municipal solid waste compost and inorganic

fertilizer on lysimeter and pot studies. Environ Technol 35,487-498

Tablas y Figuras

Tabla 1. Rendimientos del tomate

Tratam	Kg/planta
H100	5,69e
H60	4,21cd
H20	2,85b
R1 60	5,83e
R1 20	3,57bc
R1	1,28a
R2 60	5,10de
R2 20	2,90b
R2	0,50a

Tabla 2. Características del fruto

Tratam	Nºfru/p l	Firm kg	TSS %Brix	TA %Ac c
H100	73,5ab	10,41 a	5,38a	0,57a
H60	51,0bc	8,73a	5,15a b	0,5ab c
H20	36,5cd	8,81a	4,80b	0,47b c
R1+H60	74,3a	10,11 a	5,20a b	0,57a
R1+H20	46,5c	9,52a	5,38a	0,52a b
R1	19,0de	8,40a	5,10a b	0,42c
R2+H60	69,3ab	9,08a	5,30a	0,54a b
R2+H20	39,0cd	8,77a	4,83b	0,52a b
R2	7,8e	8,34a	4,80b	0,43c

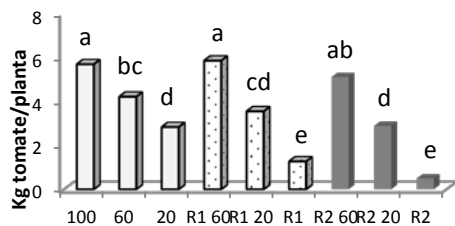


Figura 1. Producción de tomate (kg/planta)

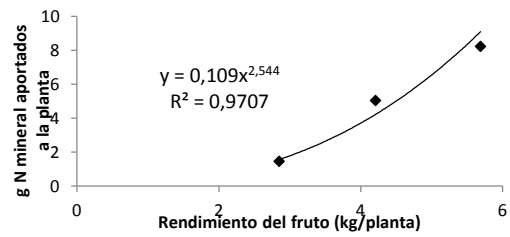


Figura 2. Relación entre el N aportado a la planta y el rendimiento en fruto

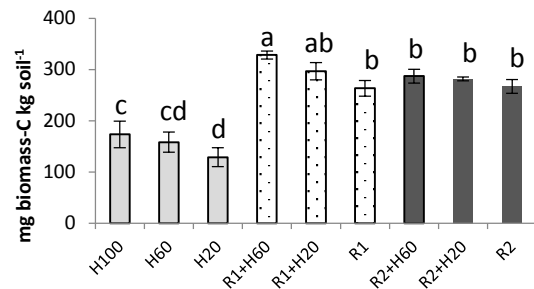


Figura 3. C de la biomasa microbiana

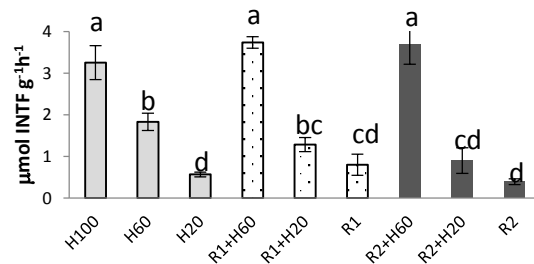


Figura 4. Actividad Deshidrogenasa

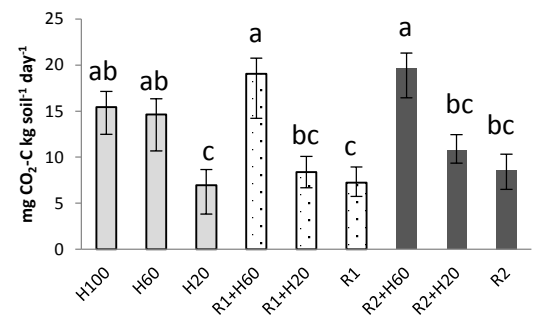


Figura 5. Respiración basal del suelo

Long-term impact of deficit irrigation on the physical quality of berries in 'Crimson Seedless' table grapes

M.R. Conesa⁽¹⁾, J. M. de la Rosa ⁽¹⁾, F. Artés-Hernández⁽²⁾, I. C. Dodd⁽³⁾, R. Domingo⁽¹⁾, A. Pérez-Pastor⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203. Cartagena (Murcia) E-mail: charo.conesa@upct.es

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

⁽³⁾ Lancaster University, Lancaster Environment Centre, Lancaster, LA1, 4YQ, UK

Abstract

A 3-year study examined the effects of DI strategies on some physical quality attributes of 'Crimson Seedless' table grape following harvest, after 28 days of cold storage at 0°C and after an additional shelf life period of 3 d at 15°C. Control vines were irrigated to ensure non-limiting water conditions (110% of crop evapotranspiration, ETC), whereas RDI and PRD treatments received 35% less water during post-veraison. The null irrigation treatment (NI) only received natural precipitation (72 % less water than the Control). Total yield and physical quality at harvest were not significantly affected by RDI or PRD. Only the NI treatment, with the worst sensory scores, decreased berry size. After cold storage, increased berry shattering within the PRD treatment was correlated with the lower ABA at the time of harvest. Neither RDI nor PRD had a significant effect on berry quality at the end of cold storage and retail period. Sensory results were similar in RDI and PRD, both providing grapes more acceptable to consumers than the control. Thus, it is possible to decrease irrigation amount by ~30 % of table grapes without adversely affecting berry physical quality.

Keywords: *Vitis Vinifera L.*; abscisic acid; firmness; shattering; PRD; storage performance

1. Introduction

Crimson Seedless is a late red-purple seedless table grape widely cultivated for its high export value. The fruit is characterized by excellent eating properties, which include a crisp berry texture and sweet flavor [1]. The most important characteristic in table cultivars for them to be marketed is firmness, since this parameter provides objective information about their physical properties [2]. Moreover, pulp compactness and berry skin consistency are important for customer acceptance of the product while knowledge of any firmness indices like skin thickness might also provide fundamental information about when the grapes can be harvested [3]. From a storage point of view, berry shattering, decay and stem browning are some of the most important factors limiting their marketability [4].

The need to optimize available water resources in Mediterranean areas has led to development of new water saving irrigation techniques, which aim to increase crop water use efficiency. Among them, regulated deficit irrigation (RDI), is based on reducing irrigation during certain periods of the crop growth cycle, when the crop presents

little sensitivity to water stress. Partial root-zone drying (PRD) is a technique that requires approximately half of the root system be allowed to dry, while the remainder of the root system is irrigated. The key point behind PRD is to expose part of the root system to drying soil and to let the roots at dry part produce signal of drying, meanwhile the remaining roots in wetted soil can maintain the water supply of the crop [1]. Very few studies about the effects of both techniques are available for table grapes [2]. To our awareness, no information exists concerning the effects of deficit irrigation on the physical properties of the berries of this cultivar at harvest and during storage at different temperatures. On the other hand, ABA is an essential hormone that regulates crop responses to various environmental stresses including drought, salinity and chilling [5]. In grapes, ABA has been considered to promote ripening and also regulate several processes concerning anthocyanin biosynthesis in coloured cultivars. Indeed, both techniques can alter ABA concentrations measured in berries which may alter berry quality [6]. This work aimed to evaluate (i) the effects of both RDI and PRD applied during post-veraison on berry physical quality during cold storage and

after a subsequent simulated retail sale period, and (ii) the possible involvement of ABA as a component of fruit quality.

2. Material and Methods

This experiment was carried out in a commercial vineyard located in Cieza (Murcia, Spain) during 2011-2013. The plant material consisted of 10 years-old vines of 'Crimson' x 'Paulsen 1103', spaced at 4 x 4 m. Four irrigation treatments were imposed: (i) a Control irrigated at 110% of crop evapotranspiration (ET_c) to ensure non-limiting soil water conditions; (ii) RDI, irrigated as the Control except during post-veraison (50% of the Control); (iii) PRD irrigated as RDI but alternating (every 10-14 days) the dry and wet sides of the root-zone, and (iv) NI (null irrigated), which received only rain water and occasional supplementary irrigation when the stem water potential (Ψ_s) exceeded -1.2 MPa. Experimental layout and other field conditions have been described in detail in [7].

2.1 Total yield, plant water status and ABA

Total yield was determined as the average cluster weight of 72 vines for each treatment. Midday stem water potential (Ψ_s) was monitored weekly with a pressure chamber (Model 3000, Soil Moisture Equipment Corp., USA) on 6 leaves per treatment according to [12]. Xylem sap was collected at predawn and measured following the protocol described by [8].

2.2 Post-harvest experiment

The cold storage and shelf life experiment lasted up to 28 days at 0°C and 90±2% relative humidity (RH) plus an additional retail shelf-life period of 3 days at 15°C and 60±5 %.

2.3 Measurements

The area, volume and the ratio area/volume were calculated following the models described by [9] approximating the berries to an ellipsoid. Berry firmness (B_F), pulp firmness (P_F) and skin firmness (S_F) were determined at harvest, after cold storage and at the end of the shelf life, with a texture analyzer LFRA 1500 (Brookfield, USA). Skin firmness (S_F) was calculated as the difference between B_F and P_F . In all cases 20 berries per replicate (60 berries per treatment) were used. The results were expressed in Newton (N). During cold storage and shelf-life, weight losses and decay were recorded using a scale with an accuracy of 0.01 g (Great Accuracy ST, Barcelona, Spain). Decay was mainly identified by the occurrence of *Botrytis cinerea* [10]. To quantify berry shattering, clusters were manually

moved for 3 s, and detached berries were weighed and expressed as % of initial fresh weight. All measurements were expressed as % of initial fresh weight and determined in 9 clusters. Sensory evaluation was also performed by a panel consisting of different trained assessors. Visual appearance, flavour, eating texture and overall quality were determined on a 5-point hedonic scale representing acceptance, while stem browning, off-flavours and berry softness were determined by the following 5-point hedonic scale in intensity of disorder [10]. Statistical analyses were subjected to analysis of variance (ANOVA) and differences were separated by Duncan-test at P<0.05 using SPSS (v.9.1).

3. Results and Discussion

The mean annual amount (2011-2013) of water applied in the control was 685 mm year⁻¹, while the RDI, PRD and NI treatments received 35%, 37% and 72% less than the control, respectively. Mean values of Ψ_s in RDI and PRD treatments were close to the control and NI was 0.2 MPa lower. In the post-veraison period, deficit irrigation decreased Ψ_s by around 0.15 MPa in RDI and PRD, and 0.3 MPa in NI respectively, compared to control plants. The same trend was observed in Ψ_{pd} throughout the experiment. Similar Ψ_s values for DI strategies were reported by [11] in 'Thomson' cv, with deficit irrigation advancing the date of bud-break compared to well-watered vines. Total yield of RDI and PRD did not differ from the control during the three years. However, the yields obtained in the NI treatment were significantly lower (43% and 34%) than the control in the years 2012 and 2013, respectively (Fig. 1). As expected, only severe deficit (NI) decreased berry size. At harvest, the greatest differences among treatments were found for berry firmness (B_F) and for skin firmness (S_F), whereas pulp firmness (P_F) was practically unaffected by moderate (RDI and PRD) and severe (NI) water deficit. After cold storage, the highest mean values of B_F were observed in control berries, whereas RDI, PRD and NI values had decreased by 28%, 9% and 40%, respectively, compared to control values. Increasing temperature to 15°C, simulating the retail sale period, reduced the differences found at harvest and at the end of cold storage (data not shown). Thus, all firmness parameters decreased at the end of the shelf period. The absolute values of weight loss agreed with the lower values of B_F in RDI treated clusters after cold storage and in control ones at the end of shelf-life, respectively. Berry shattering increased during cold storage

(Table 1) and at the end of this period, the PRD clusters showed the highest rate of berry shattering ($\approx 5\%$). High values of berry shattering reached in PRD after cold storage coincided with the lower absolute values of $[ABA]_{\text{xylem}}$ at the end of post-veraison (Fig. 2). However, at the end of shelf period, the NI treatment had the highest level of berry shattering, thus other factors such as weight loss should be considered. Decay was higher in the Control clusters during cold storage (Table 1). At the end of the shelf-life, an increased incidence of decay was observed in RDI and NI, while PRD clusters maintained the same low percentages in both storage conditions ($\approx 0.20\%$). Fig. 3 shows the main changes in sensory attributes recorded postharvest. Visually, the grapes of PRD and RDI treatments were more attractive and those of the control and NI less so, probably as a result of the less intense red colour and smaller berry size, respectively. Stem browning increased during cold storage (Fig. 3B), and was higher in the most severe irrigation treatment (NI), probably due to the enzymatic degradation of the stem cell structure caused by the low amount of water received [12]. After cold storage, the grapes from all the irrigation treatments were above the limit of marketability, and NI recorded the lowest berry size and the most dehydrated stems. After shelf period, only RDI and PRD grapes could be regarded as marketable, although very close to the limit of marketability (Fig. 3D), an observation that was crucial for establishing the maximum shelf-life period for this experiment. Indeed, sensory analyses indicated that RDI and PRD treatments performed best

4. Conclusions

PRD and RDI applied 35% less water than Control without compromising total yield or physical berry quality. Berry volume was only affected in the severe deficit treatment (NI) and recorded the worst sensory scores post-harvest. RDI and PRD did not noticeably affect quality after cold storage while the subsequent shelf-life period tended to minimize the differences found at harvest or at the end of cold storage. PRD resulted in the highest percentage of berry shattering, which was correlated with the lower absolute values of $[ABA]$ induced by the grower's irrigation strategy. Generally, most of the physical parameters tested were more affected by pre-harvest irrigation treatment differences than by postharvest storage conditions.

5. Acknowledgements

This work was supported by the projects (AGL2010-19201-C04-04) and (FP7-KBBE-2009-3-245159). M.R. Conesa acknowledges her FPU fellowship of the MICINN.

6. References

- [1] Faci J.M., Blanco O., Medina E.T., Martínez-Cob A. 2014. Effect of post veraison regulated deficit irrigation in production and berry quality of 'Autum Royal' and 'Crimson' table grape cultivars. *Agric. Water Manage.* 134:73-83
- [2] Río-Segade S., Giacosa S., Torchio F., de Palma L., Novello N., Gerbi V., Rolle L. 2013. Impact of different advanced ripening stages on berry texture properties of 'Red Globe' and 'Crimson Seedless' table grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.). *Sci Hort.* 160:313-319.
- [3] Crisosto C.H. and Crisosto G.M. 2002. Understanding American and Chinese consumer acceptance of 'Red Globe' table grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 24: 155-162.
- [4] Cantín C., Matthew W., Fidelibus M., Crisosto C. 2007. Application of abscisic acid (ABA) at veraison advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 46: 237-241.
- [5] Leung J and Giraudat J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:199-222.
- [6] Bondada B.R., Matthews M.A., Shackel K.A. 2005. Functional xylem in the post-veraison grape berry. *J Exp. Bot.* 56: 2949-2957.
- [7] Conesa, M.R., de la Rosa, J.M., Artés-Hernández, F., Dodd, I.C., Domingo, R., Pérez-Pastor, A (2014). Long-term impact of deficit irrigation on the physical quality of berries in 'Crimson Seedless' table grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture. (In press)*.
- [8] Quarrie S.A., Whitford P.N., Appleford N.E.J., Wang T.L., Cook S.K., Henson J.E., Loveys B.R. 1988. A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 173: 330-339
- [8] Cheung M and Yen M. 1996. Some simple methods for the estimation of surface area and volume of 'Thompson Seedless' grapes. (mhtml:file:///C:/Users/user/VERC-Some simple methods for the estimation of surface area and volume of 'Thompson Seedless' grapes).
- [10] Artés-Hernández F., Tomás-Barberán F.A., Artés F. 2006. Modified atmosphere packaging preserves quality of SO₂-free Superior seedless

table grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 146-154.

[11] Sellés G., Ferreyra R., Muñoz I and Silva H. 2004. Physiological indicators of plant water status as criteria for irrigation scheduling in table grapes cv. Crimson Seedless, irrigated by drip. *Acta Hort.* 664: 599–605.

[12] Conesa M.R, García-Salinas M.D, de la Rosa J.M., Fernández-Trujillo J.P., Domingo R., Pérez-Pastor A. 2014. Effects of deficit irrigation applied during fruit growth of late mandarin trees on quality harvest, chilling storage and subsequent shelf-life. *Sci. Hort.* 165: 344-351

Tables and Figures

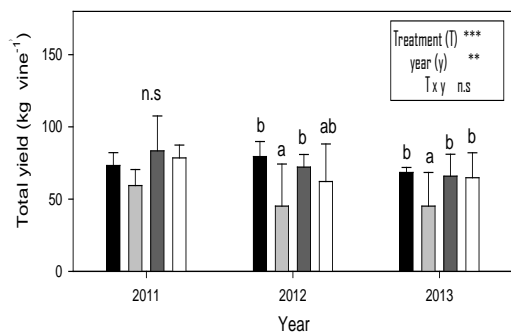


Figure 1. Mean values of the total yield (kg vine⁻¹) at harvest during the experimental period (2011-2013) in Control (■), NI (▒), RDI (▓), and PRD (□). Means ± SE (n=18 vines).

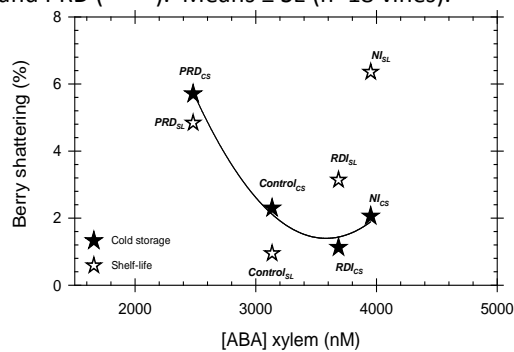


Figure 2. Relationship between xylem ABA concentration and the percentage of berry shattering postveraison at the end of cold

storage (★) and the shelf-life period (★•) in all treatments.

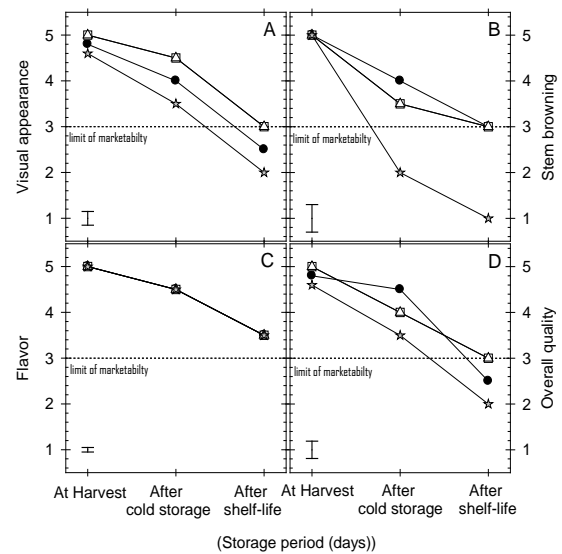


Figure 3. Sensory score for (A) berry visual appearance (B) stem browning, (C) berry flavor and (D) overall quality of clusters stored up to 28 days at 0°C (cold storage) plus an additional shelf period of 3 days at 15°C in control (●), NI (★), RDI (□) and PRD (Δ). Means ± SE (n=9).

Table 1. Mean values and standard error (n=9±SE) of berry shattering (%); decay (%) and weight loss (%) after a cold storage period of 28 d at 0°C (CS) and after a subsequent shelf period of 3 d at 15°C (SL). P-values comparing irrigation treatments within a storage condition are shown.

	Time	Control		NI		RDI		PRD		p-value ^z	
		After CS	After SL	After CS	After SL	After CS	After SL	After CS	After SL	After CS	After SL
Berry Shattering (%)	Mean	2.30	0.95	2.06	6.36	1.13	3.14	5.71	4.84	*	*
	SE	0.96	0.55	0.77	0.65	0.45	0.45	0.71	1.43		
Decay (%)	Mean	0.46	1.08	0	1.13	0	0.65	0.21	0.24	*	n.s
	SE	0.28	1.01	0	1.12	0	0.39	0.12	0.12		
Weight loss (%)	Mean	4.44	6.34	4.47	6.18	5.77	5.10	5.29	5.14	n.s	n.s
	SE	0.28	0.58	0.37	0.62	0.53	0.31	0.61	0.36		

^z indicates significant effect according to a Duncan multiple range test (P<0.05).

Landscaping criteria in Assets of Cultural Interest: Antigones Barracks in Cartagena

M.A. Guillén Pérez⁽¹⁾, J.A. Franco⁽²⁾, J. Ochoa ⁽²⁾

⁽¹⁾ Servicio de Parques y Jardines, Ayuntamiento de Cartagena. E-mail: guillen@coiarm.es

⁽²⁾ Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena

Resumen

En la línea de investigación iniciada sobre criterios de ajardinamiento en proyectos y obras en espacios históricos y entornos de Bienes de Interés Cultural, se particulariza en el caso del Cuartel de Antigones de Cartagena. Tras el estudio histórico y contextualización actual del espacio, se desprende la desconexión del paisaje y la arquitectura junto a la carencia de criterios de ajardinamiento que respeten y cohesionen paisaje, arquitectura y patrimonio en sentido amplio. La vegetación es la gran ausente en un contexto de aridez climática que han requerido de posteriores intervenciones de reparación y adecuación del entorno paisajístico, aunque con escasa repercusión en el conjunto de la obra.

Palabras clave: Espacios abiertos; paisaje urbano; jardines históricos; restauración de espacios

Abstract

Following previous research works started upon landscaping criteria for projects and works in historical urban spaces and the surroundings of assets of cultural interest, we particularly focus this study on the Antigones barracks in Cartagena. After the historical study and present contextualization of space, disconnection of landscape and architecture is apparent by the lack of landscaping criteria that gave as a result a unique set of landscape, architecture and heritage. Vegetation is largely absent in the context of climatic aridity of the area, that have required further interventions to be repair, adapting the scenic surroundings to the architectural intervention, but with little impact on the whole work.

Keywords Open places; urban landscape; historical gardens; place restoration

1. Introducción. Antecedentes

Antigones es una construcción militar del ingeniero *Mateo Vodopich* [1] de finales del S.XVIII destinada a acuartelamiento de tropas junto al antiguo Hospital de Marina (ya existente), sobre la ladera sur del Monte de *Despeñaperros, Cabezo de la Cruz o de las Brujas*; en la antigüedad *Hêphaistos* para griegos o *Mons Volcanes* para romanos. Formado por capas estratigráficas volteadas por presiones del *Mioceno*, sobre base de filitas y esquistos del *Pérmico-triásico* y coronada por rocas carbonatadas erosionadas.

Adquiere el nombre de Antigones por la cantidad de restos arqueológicos encontrados tras siglos de abandono, expolio en la sucesión y superposición de construcciones como la muralla de *Carlos III* [2] y hasta uso de los alrededores para enterramientos por epidemias de enfermedades transmisibles como la fiebre amarilla, en los siglos XVIII y XIX.

La edificación actual, remodelada en el año 2002 por los arquitectos *Martín Lejárraga* y *Fulgencio Avilés* [3], es hoy Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Telecomunicaciones y biblioteca de

la Universidad Politécnica de Cartagena, por lo que no ha perdido su uso y titularidad pública. Adquiere singularidad por ser uno de los grandes cuarteles en pie, así como por sus instalaciones - en su momento pioneras-, que lo convierten en referencia por diversos motivos de ingeniería aplicada. El entorno forma parte de los Sistemas Generales de Espacios Libres del Plan Especial de Ordenación y Protección del Centro Histórico (B.O.R.M. núm. 183 de 09/08/2006).

Con la búsqueda, recopilación y consulta de archivos y fondos documentales, se plantea como objetivo principal el análisis de los trabajos llevados a cabo en el entorno próximo de este edificio histórico (Fig. 1) con el fin de establecer criterios de ajardinamiento que mejoren el paisaje urbano e integren arquitectura, paisaje y patrimonio.

Originalmente sólo se podía acceder desde calles interiores al recinto amurallado. A finales del S.XX, a propuesta del arquitecto municipal Jesús López, con el fin de facilitar accesibilidad y recuperar vistas y atender a una vieja demanda [4], se modificó el Planeamiento, seccionando parte del cerro y derribando construcciones para dar nuevo acceso al futuro *Campus* (Fig. 2). De la

documentación obrante, se deduce que el primer ajardinamiento (en la fachada Norte del Hospital y en parterres de las proximidades) data del primer cuarto del S.XX. Y se hizo con intensidad, a tenor del plano adjunto de 1912 (Fig. 3). El origen de este jardín, hoy asfaltado y hormigonado, servía de salida y esparcimiento de la convalecencia del hospital.

De la evolución entre los vuelos de 1928 y 2013, se aprecia que donde hubo jardines, hoy hay aparcamientos y aunque la superficie verde ha aumentado notablemente en las cercanías, ha sido en detrimento de la calidad del paisaje, poco acorde con el original conjunto arquitectónico. En el perímetro de la edificación sólo hubo construcciones adosadas y lajas de suelos de pizarra y roca. La estructura superficial del suelo que sustenta el edificio, apreciable aún en la atarazana próxima, no pudo admitir jardines, no sólo por la naturaleza del terreno, sino la sobriedad propia de construcciones militares que guarnecían en altura la plaza y su defensa artillera [5] como fuerte Caballero.

La necesidad de ajardinar surge tras la creación de espacios libres entre el viejo cuartel de infantería y sus nuevas aceras o viales, cuyo tratamiento sólo se fundamentó en acondicionar antes de su inauguración oficial, pues el proyecto de rehabilitación arquitectónica se limitó a la rehabilitación estructural, sin contemplar entorno alguno. Sin existir capítulo de jardinería, se recurrió al asesoramiento del propio cliente destinatario: la Universidad. Plasmando alguna de las ideas aportadas, la dirección y la constructora decidieron resolver mediante la formación en el basamento de un talud artificial con importante aporte de tierra sin seleccionar, instalación superficial de mangueras de riego agrícola y plantación de *Carpobrotus edulis* (catalogada exótica invasora) [6] y *Sedum sediforme*. Por consejo de profesores de la E.T.S. de Ingeniería Agronómica, se plantaron algunas especies autóctonas, entre las que ha sobrevivido algún ejemplar de *Tetraclinis articulata*. Salvo esa circunstancia, la resolución del BIC no difirió demasiado del tratamiento empleado por esos años en cualquier talud de balsa de purines de una explotación porcina o de una depuradora.

En su fachada por el Este, junto al Centro de Transformación del edificio, se levantaron muros de los denominados “ecológicos” en catálogos comerciales, mediante piezas prefabricadas -sin plantas- que minusvaloran el paño, al asemejarse más a un talud de autopista que a un edificio del

S.XIX. En parte, permanecen hoy disimulados por la vegetación.

2. Propuesta de resolución

Figurando aún en la base de datos catastral de 2010 la titularidad municipal por Convenio con el Ministerio de Defensa, sin constar la cesión efectuada años atrás a la Comunidad Autónoma, propusimos al Ayuntamiento la adecuación del entorno, procediéndose al desmonte parcial del talud perimetral (Fig. 4), con la idea de recuperar la roca original -que es lo que debiera haber alrededor de una edificación militar tan sobria como esta-, comprobándose en las primeras catas la presencia de restos de piedra caliza de *tabaire* (probablemente procedente de demoliciones anteriores, al ser material de canteras locales muy utilizado durante siglos) entre la tierra de labor.

Hubo dos condicionantes para resolver la ladera: No pudo acabarse superficialmente en piedra por la existencia de una solera de hormigón en la cumbre del talud, por lo que hubo que ocultar la sección transversal de esa cama de hormigón mediante la colocación perimetral de un encintado de basamentos de *tabaire* (bloques de calizas procedentes de canteras cercanas y recuperadas de los restos de la vieja plaza de toros, hoy yacimiento arqueológico del anfiteatro romano). Y no se pudo completar el talud de roca al aparecer zona de esquistos (Fig. 5), optándose por desmontar hasta donde pudo dejarse vista la roca (como originalmente) y salvar los desniveles y arrastres de pizarra mediante la construcción de un murete desigual con bloques de *tabaire* colocados a asentamiento, sin mortero o argamasa, plantando romero rastrero en los huecos dejados a propósito. A distancia, la imagen resultante intenta -en lo posible- naturalizar el espacio en las zonas del talud donde no ha aflorado la roca. Los nuevos bloques no coinciden con los materiales de la edificación, pero ofrecen el aspecto de restos antiguos desordenados, sobresaliendo entre la vegetación.

2.1 La vegetación y la jardinería

A Levante del edificio se procede a la plantación de vegetación autóctona (Fig. 5) formada por: *Olea europaea* var. *sylvestris*, *Tetraclinis articulata*, *Chamaerops humilis*, *Pistacia lentiscus*, *Punica granatum*, *Nerium oleander*, *Myrtus communis*, completando el espacio con cubierta vegetal herbácea a base de *Lavandula dentata*, *Asteriscus maritimus*, *Limonium*

caesium y *Rosmarinus officinalis postratus* y *Chrithum maritimum*. En el parterre contenido en la acera próxima al pretil de la muralla encontramos: *Teucrium fruticans*, *Berberis Thumbergii*, *Punica granatum*, *Santolina chamaecyparissus* y *Rosmarinus officinalis*.

Todas las especies contenidas constituyen parte representativa de la flora vascular regional autóctona, constituyente del paisaje natural local. Necesariamente se elimina la alineación de *Brachychiton populneum* (Fig. 6), por estar fuera de contexto y romper "The wall-line", al tratarse de una barrera visual de escasas virtudes ambientales, culturales y paisajísticas, con gran disformidad; plantados en el extremo de la plataforma de la acera y que sobresalían visualmente sobre el antepecho de la muralla.

Por el contrario, decidimos mantener un grupo de *Tipuana tipu*, por su utilidad en áreas terrazas fuertemente soleadas en ese adarve, sirviendo de estancia provisional en una zona de transición. Se decide colocar en su perímetro bloques de piedra de demoliciones para evitar el indiscriminado aparcamiento de vehículos que, subiéndose a las aceras, buscaban espacio y sombra.

Resulta necesario reivindicar la recuperación del jardín formal con ejes de simetría característicos de un estilo prácticamente olvidado como es la jardinería militar, y que no es otro que el jardín clásico español, formado principalmente por parterres floridos. Esta recuperación, permitiría dotar de unidad paisajística los distintos edificios rehabilitados en el entorno al tiempo que daría sentido al BIC y a su entorno (frecuentemente ignorado en los numerosos bienes de la Región de Murcia). Además del aspecto cultural, estos espacios cumplirían con funciones ambientales relevantes en el ámbito de la sostenibilidad de una institución pública como la Universidad.

2.2 Otros elementos

Los proyectos de remodelación o rehabilitación de edificios catalogados contemplan intervenciones en su entorno, pero rara vez incluyen estudios paisajísticos. Además de aspectos meramente constructivos o de instalaciones (pavimentos, báculos del alumbrado,...), sí que hay intervenciones en el ornamento, pero con agentes importados relacionados más con el mobiliario urbano o estatuario. Y, en todo caso, el esfuerzo destinado a la resolución del paisaje no es proporcional al realizado en el interior del edificio.

Al permanecer globalmente inalterado, el espacio urbano que forma Antigones, Hospital de Marina y Muralla del Mar, podría ser objeto de una filmación sobre la Cartagena del XVIII-XIX. Pero los elementos extraños instalados en las últimas intervenciones han distorsionado el paisaje urbano. Es el caso del avión CASA-101 cedido por la Academia General del Aire de San Javier (Murcia) y su ajardinamiento en pendiente con grava blanca, que junto al muro de hormigón (Fig. 7), se han convertido en evidentes protagonistas del espacio, descontextualizando el paisaje esta obra promovida por la Universidad.

Hay más elementos distorsionadores: Las canalizaciones de evacuación de pluviales en la fachada de un edificio que, curiosamente, fue ejemplo de lo contrario (aprovechamiento de agua), sin meditar suficientemente los efectos negativos de la caída libre de aguas desde más de diez metros, la presencia continua de contenedores o el carril-bici próximo, promovido en 2010 por el Ayuntamiento con financiación del Estado, sobre solera de hormigón atravesando longitudinalmente la única gran pradera de la ciudad, a los pies del paño de muralla por Levante.

3. Conclusiones

La remodelación del cuartel de Antigones no es una excepción en cuanto a ausencia de criterios de adecuación paisajística del entorno de un BIC, tratándose tanto de carencia de interés como de desconocimiento técnico.

La jardinería demandada para cubrir los nuevos espacios creados junto a las edificaciones catalogadas, además de ser útil o sostenible, debe estar en concordancia con el espacio, y conforme al Convenio Europeo del Paisaje, debe considerar los valores naturales y culturales ligados a la diversidad y calidad de los paisajes.

4. Referencias bibliográficas

- [1] López-Sánchez J.F. 2011. Antigones. Apuntes para la historia de un cuartel. Revista Espacio-Teleco: Revista de la ETSIT-UPCT 2: 153-168.
- [2] Rubio Paredes J.M. 2001. Historia de la Muralla de Carlos III en Cartagena. Ed: Caja de Ahorros del Mediterráneo. Cartagena, España.
- [3] Lejárraga M., Avilés F. 2002. Rehabilitación del Cuartel de Antigones. Universidad Politécnica de Cartagena. Catálogos de Arquitectura 10: 84-89.

[4] Pérez Rojas F. J. 1986: *Cartagena 1874-1936*. Ed: Editorial Regional de Murcia. Murcia, España. Pág. 97-100.

[5] Martínez J.A., Munuera D., Gómez Vizcaíno A. 2002. Catálogo de fortificaciones y baterías. Ed: Dirección General de Cultura de la Región de Murcia. Pág. 468-471.

[6] R.D. 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras. BOE 185 de 3 de agosto de 2013.

Figura 3. Plano Julián Páez que revisó Spottorno



Figura 4. Acondicionamiento del talud

Figuras



Figura 1. Hospital, cuartel y Despeñaperros



Figura 5. Suelo inicial e imagen resultante



Figura 2. Accesos antes y después de urbanizar



Figura 6. *Brachyctyon populneum* eliminados

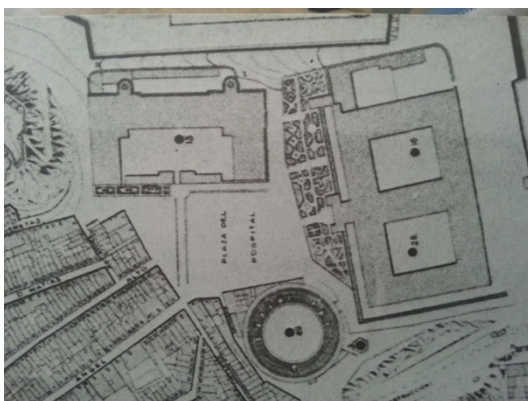


Figura 7. Elementos distorsionadores

Suitability of using trunk diameter fluctuations for irrigation management in sub-surface drip irrigation in lemon trees

J.M. Robles, P. Botía, J.G. Pérez

Equipo de Riego y Fisiología del Estrés, Departamento de Recursos Naturales, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), C/Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia) España. juanm.robles@carm.es

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la idoneidad del uso de las variaciones de diámetro de tronco para la programación del riego por goteo subterráneo en árboles adultos de limonero. Para ello, se compararon árboles adecuadamente regados en riego por goteo superficial (SUR) y subterráneo (SUB). Se mantuvo, en ambos sistemas, el contenido de agua del suelo en la zona radicular entorno al 80 % del agua útil disponible y el potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_{md}) > -1.3 MPa. Las ecuaciones de referencia generadas entre la máxima contracción diaria del tronco (MDS) y meteorológicas (evapotranspiración de referencia, déficit de presión de vapor y temperatura de aire) fueron diferentes para cada sistema de riego. En ambos casos, la variable que mejor se correlacionó con Ψ_{md} y MDS fue la temperatura. La relación entre MDS y Ψ_{md} estuvo influenciada por el sistema de riego, siendo la pendiente de SUB significativamente menor. Basándonos en estos resultados, la medida del MDS puede ser apropiada para el ajuste de la programación del riego en limonero, pero las diferencias encontradas entre los sistemas de riego en las líneas base de referencia del MDS pone de manifiesto la necesidad de determinar las líneas de base para cada sistema de riego.

Palabras clave: Máxima contracción diaria del tronco; relaciones hídricas de la planta; eficiencia en el uso del agua.

Abstract

The aim of this work was to assess the suitability of using trunk diameter fluctuations for irrigation scheduling in subsurface drip irrigation system in adult lemon trees. Trees were maintained well-watered for surface (SUR) and subsurface (SUB) drip irrigation systems by applying irrigation water independently, maintaining in both systems the soil water content of the rootzone \approx 80% of the amount of water available and the midday stem water potential (Ψ_{md}) > -1.3 MPa. The results indicated that the reference equations generated from maximum daily trunk shrinkage (MDS) and reference evapotranspiration (ET_0), vapour pressure deficit (VPD) and mean air temperature (T) parameters were different for each irrigation system, although there were not significant differences in the slopes of the MDS reference equations indicating that the prediction powerful of MDS was similar in both systems. In both cases, the environmental variable that best correlated with Ψ_{md} and MDS was T . The relationship between MDS and Ψ_{md} was also influenced by the irrigation system, being the slope of SUB significantly lower. The results suggested that MDS measurements can be suitable for adjusting the irrigation scheduling of lemon trees, but differences found between irrigation systems in the MDS reference baselines underline the need to determine the baselines for each irrigation system.

Keywords: maximum daily trunk shrinkage; plant water relations; water use efficiency.

1. Introducción

La disponibilidad de fuentes de agua dulce para el riego está disminuyendo, de forma general, en todas las partes del mundo, y los conflictos entre los intereses urbanos y agrícolas con el tema del agua siguen en aumento. Esta situación se agrava en el área mediterránea de la península ibérica, caracterizada por un clima semiárido con escasas precipitaciones y una demanda evaporativa elevada.

España es el primer exportador mundial de limón para consumo en fresco. La principal zona

productora de limón (*Citrus limon* Burm. F.) es el sureste de la Península Ibérica (provincias de Murcia y Alicante), donde se concentra más del 80% de la producción (www.magrama.gob.es). En estas regiones, uno de los factores más importantes que limitan la producción es la escasez de recursos hídricos. El avance en el desarrollo de nuevas estrategias de riego, que ayuden a mejorar la eficiencia en el uso del agua, es primordial para los productores de cítricos, de cara a mantener unos adecuados niveles de producción y calidad del fruto y seguir siendo competitivos en los mercados.

La utilización del riego por goteo subterráneo (SUB) puede ayudar a la mejora de la eficiencia en el uso del agua [1]. Dicho sistema, reduce el consumo de agua, minimizando las pérdidas de agua por evaporación y percolación profunda, lo que permite mantener o incluso aumentar el rendimiento del cultivo [2]. Sin embargo, el SUB presenta dificultades para su correcto manejo debido a la falta de indicadores representativos, el establecimiento de valores umbrales de potencial hídrico de tallo (Ψ_{md}) y niveles de referencia derivados de las fluctuaciones de diámetro de tronco (TDF) con variables meteorológicas que permitan optimizar la programación del riego.

En general, los estudios de programación del riego en cítricos basados en TDF han sido realizados en riego por goteo superficial, sin embargo, hay escasa información sobre como el sistema de riego por goteo subterráneo puede afectar a la estabilidad de las líneas de referencia basadas en las TDF [3]. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la influencia del sistema de riego (superficial y subterráneo) sobre de las líneas base para la programación del riego en árboles adultos de limonero 'Fino 49' injertado sobre *Citrus macrophylla* Wester.

2. Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo durante los años 2011 y 2012 en una finca experimental del IMIDA ubicada en Torre Pacheco (Murcia), sobre árboles de 18 años de edad de limonero 'Fino 49' (*Citrus limon* (L.) Burm. Fil.) injertados sobre el patrón *Citrus macrophylla* Wester y con un marco de plantación de 8 m × 3 m. Se utilizaron dos sistemas de riego: riego por goteo superficial (SUP) y subterráneo (SUB). En ambos casos, se dispuso de dos líneas portagoteros (UniRamTM, diseñada especialmente para el riego subterráneo, Netafim, Tel Aviv, Israel) por fila de árboles, separados 1 m de cada lado del tronco, con 6 goteros autocompensantes, anti-sifón y antidrenantes (3,5 L h⁻¹) por árbol a 1 m de distancia entre sí. En el sistema de riego por goteo subterráneo, las líneas portagoteros fueron enterradas a 40 cm de profundidad al inicio de 2007.

La cantidad de agua aplicada se determinó de forma independiente para cada sistema de riego, mediante la estimación semanal la evapotranspiración del cultivo (ETc), utilizando la ecuación: $ETc = Kc \times ET_0 \times Kr$, donde Kc es el coeficiente del cultivo y Kr el coeficiente

corrector en función del porcentaje de área sombreada por el cultivo. Se ajustó la dosis de riego final aplicada para mantener en ambos sistemas la humedad del suelo en la zona radicular más activa (10-50 cm de profundidad en superficial y 20-60 cm de profundidad en subterráneo) \approx 80% de la cantidad de agua disponible (AWA) y el potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_{md}) $>$ -1,3 MPa. El diseño experimental fue de bloques al azar. Cada tratamiento consistió en nueve árboles, (tres bloques y tres repeticiones) monitorizando seis árboles por tratamiento (dos árboles por tratamiento y bloque).

Las variables meteorológicas (temperatura media diaria del aire, el déficit medio diario de presión de vapor (DPV), la humedad relativa media diaria y ET₀ diaria) se obtuvieron diariamente de una estación meteorológica automática situada en la finca experimental. El contenido volumétrico de agua del suelo (θ_v) se midió semanalmente durante todo el experimento, utilizando una sonda portátil FDR (Diviner 2000®, Sentek Pty. Ltd., Australia) previamente calibrada en la finca experimental. El Ψ_{md} se midió en las horas centrales del día (12:00-14:00) con una cámara de presión (modelo 3000; Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, California, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones de Turner [4]. El perímetro del tronco se midió al principio y al final de cada fase de crecimiento del fruto. El área de sección transversal del tronco (ASTT, cm²) se calculó como $ASTT = (\pi \times D^2)/4$, donde D es el diámetro del tronco (cm). El diámetro del fruto se determinó cada 7-14 días en 10 frutos por árbol y en 6 árboles por tratamiento (n = 6); los frutos fueron marcados en la etapa inicial del desarrollo del fruto. Durante la cosecha, se controlaron individualmente el peso fresco y el número de frutos de cada árbol.

Las fluctuaciones de diámetro del tronco (TDF) se obtuvieron de forma continua mediante dendrómetros extensiométricos (mod. Plantsens, Verdtech S.A., Huelva, España) instalados en lado sur-oeste del tronco (40 cm por encima del suelo y 15 cm por encima de la unión del injerto), y sobre soportes construidos de aluminio e invar. De las mediciones de TDF se calcularon: máximo (MXTD) y mínimo (MNTD) diámetro diario del tronco, máxima contracción diaria del tronco (MDS = MXTD - MNTD) y la tasa de crecimiento diario tronco (TGR, calculado como la diferencia entre MXTD de dos días consecutivos) [5].

Las relaciones entre Ψ_{md} y MDS y las variables atmosféricas fueron estudiadas mediante un análisis de regresión lineal y no lineal con covarianza para determinar la influencia del sistema de riego. El análisis de la varianza (ANOVA bifactorial) se utilizó para discriminar el efecto año y sistema de riego en los parámetros productivos y de crecimiento del árbol.

3. Resultados y Discusión

El sistema de riego por goteo subterráneo mejoró la eficiencia en el uso del agua (tabla 1), consiguiendo un ahorro de agua de riego, respecto al sistema de riego superficial, de un 24% y un 15% para 2011 y 2012, respectivamente (figura 1 A y B). El menor volumen de agua aplicado en SUB no afectó al estado hídrico del cultivo (figura 1 C y D), manteniendo un desarrollo del fruto (figura 1 G y H) y una respuesta productiva similar al SUP (tabla 1). Sin embargo, se observó un patrón de crecimiento del tronco diferente entre ambos sistemas de riego (figura 1 G y H). Éste hecho también quedó reflejado en una reducción significativa del ASTT en SUB (tabla 1).

La estabilidad de las líneas base obtenidas para cada sistema de riego no estuvo afectada por cambios anuales en la producción ni la carga de frutos [6], sino principalmente por la dinámica estacional del crecimiento del tronco en cada sistema de riego. Las ecuaciones obtenidas entre Ψ_{md} y las variables climáticas diarias (ET_0 , VPD y T), en ambos años, no estuvieron influenciadas por el sistema de riego (figura 2 A, B y C). Sin embargo, estas ecuaciones fueron diferentes para cada sistema de riego (figura 2 E, F, G), aunque no hubo diferencias significativas en las pendientes de las ecuaciones, indicando que la predicción de MDS fue similar para ambos sistemas de riego (figura 2 D, E y F). En ambos casos, la variable ambiental que mejor se correlacionó con Ψ_{md} y MDS fue T [7]. Finalmente, la relación obtenida entre MDS y Ψ_{md} estuvo significativamente alterada por el sistema de riego, siendo la pendiente menor en los árboles en riego subterráneo, debido principalmente a una diferente dinámica de crecimiento del tronco en SUB (figura 3), poniendo de manifiesto la necesidad de la realización de diferentes líneas de referencia para la programación del riego para ambos sistemas.

4. Conclusiones

De acorde a los resultados obtenidos, el uso de la MDS puede ser adecuado para el ajuste de la programación del riego en limonero, pero determinando las líneas de base para cada sistema de riego.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el "Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias", a través del proyecto RTA 2012-00102-00-00, con la colaboración del Fondo Social Europeo de la Unión Europea FEDER al 80%.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Camp C.R., 1998. Subsurface drip irrigation: a review. *Trans. ASAE* 41 (5), 1353–1367.
- [2] Camp C. R., Lamm F. R., Evans R. G., Phene C. J. (2000). Subsurface drip irrigation – past, present and future. In *National Irrigation Symposium*, November 14–16, Phoenix, Arizona, pp. 363–372. ASAE, St. Joseph, MI, USA.
- [3] Fernández J.E., Cuevas M.V., 2010. Irrigation scheduling from stem diameter variations: a review. *Agric. For. Meteorol.* 150: 135–151.
- [4] Turner N.C., 1988. Measurements of plant water status by pressure chamber technique. *Irrig. Sci.* 9, 289–308.
- [5] Goldhamer D.A., Fereres E., (2001) Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. *Irrig. Sci.* 20:115–125.
- [6] Ortuño M.F., Brito J.J., García-Orellana Y., Conejero W., Torrecillas A. (2008) Maximum daily trunk shrinkage and stem water potential reference equations for irrigation scheduling of lemon trees. *Irrig. Sci.* 27:121–127
- [7] Ortuño M.F., García-Orellana Y., Conejero W., Ruiz-Sánchez M.C., Alarcón J.J., Torrecillas A. (2006) Stem and leaf water potentials, gas exchange, sap flow, and trunk diameter fluctuations for detecting water stress in lemon trees. *Trees* 20:1–8.

Tablas y Figuras

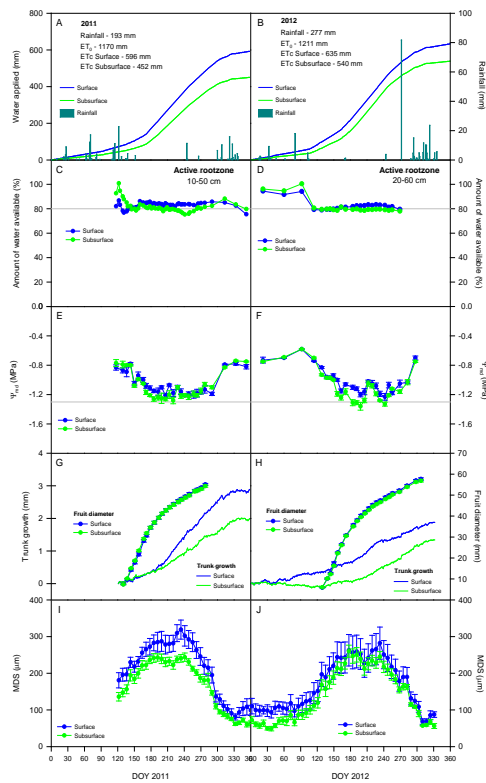
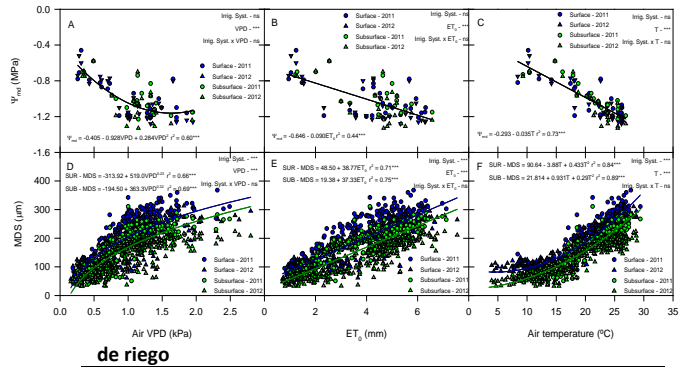


Figura 1. Agua aplicada acumulada (A y B) para cada sistema de riego (SUR y SUB) y lluvia. Evolución estacional (C y D) de la cantidad de agua disponible (AWA) en la zona activa radicular, (E y F) del potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_{md}), (G y H) del diámetro del fruto y el crecimiento relativo del tronco, (I y J) Valores medios semanales de la máxima contracción diaria del tronco (MDS).

Tabla 1. Parámetros productivos, eficiencia en el uso del agua (EUA) y área de la sección transversal del tronco (ASTT) para ambos sistemas de riego (superficial y subterráneo) durante 2011 y 2012.



de riego
 ns, * y ** indica no significativo, $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente. (n=6).

Figura 2. Relaciones entre (Ψ_{md}) y (A) déficit de presión de vapor de aire (VPD), (B) evapotranspiración de referencia (ET₀), (C) temperatura media diaria del aire (T) y relaciones entre (MDS) y (D) déficit de presión de vapor del aire (VPD), (E) evapotranspiración de referencia (ET₀) y (F) temperatura media diaria del aire (T) para cada sistema de riego (SUR) y (SUB). Cada punto es la media de 6 medidas. *** y ns indican $P < 0,001$ y no significativo, respectivamente.

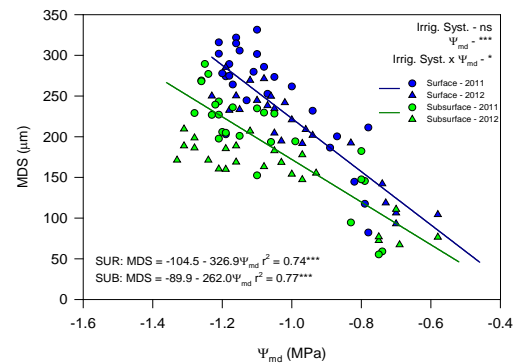


Figura 3. Relación entre la máxima contracción diaria del tronco (MDS) y el potencial hídrico de tallo a mediodía (Ψ_{md}) para cada sistema de riego. Cada punto es la media de 6 medidas. *, *** y ns indican diferencias significativas a $p < 0,05$, $P < 0,001$ y no significativas, respectivamente.

Ruiz Hidalgo Park in Murcia (1908-1955)

F. Medina⁽¹⁾, S. Bañón⁽²⁾, J. Ochoa⁽²⁾

(1) Servicio de Medioambiente. Ayuntamiento de Murcia. email: francisco.medina@ayto-murcia.es

(2) Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena.

Resumen

Se estudia el primer parque público de la Región de Murcia a través de la Guía del Parque escrita por Codorniu, el primer documento de ésta índole publicado en España. La ciudad de Murcia disfrutó de un Parque en la ribera del río Segura entre 1908 y 1955. Fue construido junto a las edificaciones mas representativas de la ciudad y llegó a suponer un 6% de superficie de zona verde en la misma. Promovido por Ricardo Codorniu fue concebido desde la idea de un arboreto donde mostrar diferentes especies a la población y obtener conocimientos sobre las condiciones de aclimatación para posibles usos forestales. El Parque albergó gran número de actividades sociales desarrolladas en la ciudad hasta recibir el abandono de las autoridades antesala de su destrucción.

Palabras clave: Parque de ribera; Sotos del río Segura; Arboreto; Ricardo Codorniu.

Abstract

The Garden is studied through the Guide to the Park written by Codorniu. This Guide was the first document of this nature published in Spain. The city of Murcia had a park on the riverside of Rio Segura from 1908 to 1955. This huge garden was built next to the landmarks of the city and it represented 6% of green space over the total city area. It was promoted by Ricardo Codorniu and its main purpose was to show people the different plant species and to get the necessary information to adapt these plants to possibly forest uses. The Park was the centre of countless city social activities and it was abandoned by the city authorities who led to its completely destruction.

Keywords: riverside park; groves of Segura river; Arboretum; Ricardo Codorniu.

1. Introducción

Las incipientes preocupaciones ambientales de la sociedad española comenzaron a convertirse en iniciativas populares a fines del XIX. En 1896, se realizó una plantación popular en el Cerro del Centinela en Ciudad Lineal de Madrid, pero el gran difusor de estas ideas fue el ingeniero de Montes Rafael Puig i Valls que en 1898 fundó la Sociedad de Amigos del Árbol que celebrará en Barcelona las Fiestas del Árbol.

Las actividades que se desarrollaron condujeron a que en 1904 el Gobierno "*reconociendo que por iniciativas privadas se viene celebrando la Fiesta del Árbol*", dictara un Decreto (R.D. 11 de marzo de 1904) para procurar los medios de extenderla a todos los municipios, fijando como objetivo "*la formación de alamedas o plantaciones lineales a lo largo de los caminos y de los cursos de agua*". En el mismo se indicaba que se suministrarían los plantones necesarios, para realizarlas de forma gratuita, desde los viveros de los Distritos Forestales.

El Gobierno estableció un sistema de financiación de las actuaciones por la Fiesta del Árbol basado

en el número de ejemplares arraigados o prosperados. De esta manera por cada 500 pies arraigados se premiaría con 50 pesetas en el caso de que las semillas o plantones empleados se hubieran obtenido gratuitamente desde los viveros oficiales y 75 pesetas en el caso de que se hubieran adquirido en el comercio.

Al amparo de estas iniciativas muchos ayuntamientos llegarán incluso a abrir nuevos parques como en Toledo el Parque Escolar (1906) o los de Albacete: el Parque de la Fiesta del Árbol (1906) y el Parque Abelardo Sánchez (1910).

En Murcia fue Ricardo Codorniu quien convenció al alcalde Jerónimo Ruiz Hidalgo (1907-1909) para la construcción de un parque en los sotos del río Segura aprovechando las ventajas que proporcionaba la celebración de la Fiesta del Árbol. Se inauguró el 23 de febrero de 1.908.

En 1909 se dictaron normativas (R.O. de 30 de junio de 1909, Gazeta de Madrid nº 186, de 5 de julio de 1909) para regular las subvenciones para la realización de la Fiesta del Árbol. Será a partir de 1915 (R.D. de 5 de enero de 1915) cuando "*Se declara obligatoria la celebración anual de una*

Fiesta del Árbol en cada término municipal” y se dicta que “Los Ayuntamientos deberán consignar en los presupuestos municipales aquellos gastos que se consideren necesarios para adquisición de terrenos donde ello sea posible, siembras, plantaciones, riegos y demás gastos indispensables para la celebración de las Fiestas”.

2. Construcción del Parque

El Parque se ubicó en unos terrenos de aluvión situados en la ribera izquierda del río Segura al pie del flanco sur de la ciudad. Constituían un gran banco de arenas que las repetidas avenidas sucedidas en un periodo anterior de unos 100 años, habían ido depositando como consecuencia de las obras de encauzamiento que se ejecutaron en la confrontación de la ciudad de Murcia.

Hasta 1908, parte de los sotos del río se destinaron como tierra de cultivo, otra parte servía de lavadero público, se utilizaba por pescadores y era pasto para ganado menor. Pero también se vertían los desechos del Hospital de San Juan de Dios lo que convertía a los sotos en un lugar muy insalubre.

En 1908, cuando se construyó el parque, este gran depósito de arenas alcanzaba una superficie cercana a los 50.000 m², de los que 44.500 m² fueron ocupados por el parque, quedando el resto como taludes hacia el río.

Codorniú escribe que desde que se creara en 1888 la División Hidrológico Forestal del Segura, pretendía que el Ayuntamiento cediera parte de los sotos para establecer unos viveros y un arboreto, pero que hubo de esperar a que ocupara la alcaldía don Jerónimo Ruiz Hidalgo (1907-1909) que tenía en proyecto realizar un parque en ese paraje [1].

El Parque se inauguró el 23 de febrero de 1908. Pocos días antes, el 21, se había celebrado en él, por primera vez en Murcia, la Fiesta del Árbol.

3. El Parque en la ciudad de Murcia

La resistencia inicial a la construcción de un parque en una zona inundable, surcada de charcas precisamente en una época donde el paludismo se cebaba con la población, fue modificándose al retirarse malezas, escombros y basuras de los terrenos. Una vez realizadas las plantaciones, el grado de aceptación fue cada vez mayor. En palabras del influyente periodista José Martínez Tornel [2]: *“El Soto del Río quedará hoy*

consagrado como cosa murciana, nuestra, de todos, a la cual empezaremos a tomar cariño, hasta que le tengamos el mismo que a la Torre, el Malecón y a la Glorieta. Y los que nos sucedan se encargarán de defenderlo, contra cualquiera que lo quiera destruir”.

El Soto del Río había pasado a ser un Parque de Ribera y Murcia, de esta manera, se adelantaba a las iniciativas de ordenamiento de entornos fluviales con procedimientos que no fueran los simples encauzamientos con empleo de materiales duros (Fig. 1).

En ese momento las zonas verdes de la ciudad son: Santa Isabel, Santo Domingo, Glorieta y Floridablanca. Este último jardín era el de mayor superficie en la ciudad hasta que el Parque de Ruiz Hidalgo lo cuadruplicara en extensión.

Con la apertura del parque la ciudad se dotó de un espacio verde de 44.500 m², casi 40 tahúllas, que representaba el 6% de la extensión superficial del caserío en ese momento. Solamente la aportación del Parque permitía cumplir las ratios de zonas verdes recomendadas actualmente, con mas de 100 años de anticipación (Fig. 2).

4. Concepto del Parque

El Parque quedaba delimitado por el río Segura a su derecha y el murallón de encauzamiento a la izquierda que lo separaba del frente edificado de la ciudad.

En la concepción del Parque primó su condición de zona sometida a inundaciones y a esta característica se supeditó la ordenación, el tratamiento de los caminos, la disposición de elementos de ornamento etc.

En el tiempo de vida del Parque están registradas treinta y dos avenidas del Segura que inundaron en mayor o menor medida el mismo. Curiosamente durante los primeros nueve años no sucedió ninguna, pero un periodo tan largo entre inundaciones no se volvió a repetir.

Desde el año 1942 hasta el 1951, las inundaciones sucedieron cada año, incluso se repetirían hasta tres en un mismo año. Esta reiteración sería uno de los factores que jugaron a favor de los detractores del Parque.

Aproximadamente en su mitad quedaba surcado por la estructura del Puente de Hierro, motivo que fue aprovechado para marcar dos partes sensiblemente diferentes; la parte occidental y la oriental. La primera será la cedida a la División

Hidrológico Forestal para la ubicación de un vivero. La segunda recibirá un tratamiento de parterres de formas sinuosas, cruzados por senderos y en las encrucijadas de estos, fuentes o plazoletas.

El diseño parte de un amplio eje que establecía la conexión de todo el parque. En él se diferencia un camino central destinado a carruajes y sendos caminos laterales destinados a la circulación peatonal. Sin duda el conocimiento de las soluciones dadas en otros parques, como el ofrecido por Loudon en Derby Arboretum, por Paxton en Birkenhead o por Olmsted para Central Park de Nueva York, influyeron para el diseño de los tránsitos independientes en Parque Ruiz Hidalgo. Estas soluciones fueron comunes para los parques de la segunda mitad del XIX y con toda seguridad sirvieron de referencia a Codorníu (Fig. 3).

El camino central está destinado a caballerías y carruajes y adquiere, por sus dimensiones de unos 12 metros de anchura, una mayor importancia. Queda encintado, como de una alameda decimonónica, de ejemplares de *Platanus hispanica* y por una marcada cuneta para evacuación de aguas.

Los caminos laterales, destinados a los tránsitos peatonales, tienen una anchura de unos cinco metros y en sus márgenes exteriores se realizarán plantaciones diferentes. Al comienzo y en el tramo de la rampa, se plantará *Robinia pseudoacacia*. Desde el final de la rampa hasta cruzar el Puente Nuevo no se realizan alineaciones de arbolado y desde aquí hasta el final del Parque se plantarán mayoritariamente *Phoenix dactylifera* alternada con alguna *Phoenix canariensis*.

5. El lugar a través de la *Guía del Parque*

En la *Guía del Parque* [1], Codorníu identificará las 144 especies diferentes que se plantaron en la realización del Parque, pertenecientes a 51 familias botánicas. Advierte que “*ha sido escrito sin pretensiones científicas... los botánicos habrán de hacer rectificaciones importantes*”.

La disposición de las plantaciones atiende a un interés pedagógico que el propio Codorníu nos confiesa: “*pretendía establecer un vivero y un arboreto que fuera ligera muestra del cultivo forestal*”.

Antecedentes de arboretos se habían realizado en España en la provincia de Huelva con el interés de conseguir especies forestales con interés en

producción de madera, leña o carbón. A partir de 1878 se introdujeron numerosas especies de eucaliptos, que en los arboretos alcanzaron el número de 130 especies diferentes. Por lo que sabemos de ellos sólo eran a manera de colecciones de árboles [3].

Codorníu seguirá el concepto de arboreto para darle contenido a un parque público, de igual manera que hizo Loudon en 1840 al proyectar “Derby Arboretum”.

En la Guía se recogerán características botánicas, anécdotas, curiosidades y también plasmará su punto de vista estético con respecto a algún ejemplar, especie o grupo de plantación.

Codorníu aprovechó la construcción del Parque como ensayo de un género botánico [4-6], los eucaliptos, del que estaba convencido que aportaría especies idóneas para las repoblaciones forestales pendientes en el Sureste de España. Integrados en la familia botánica de las Mirtáceas donde se encuentran plantas que producen aceites esenciales y con flores muy vistosas debido al gran número de estambres. En esta familia solo se encuentra una especie autóctona el *Myrtus communis*, pero actualmente diversos géneros proporcionan muchas de las plantas ornamentales empleadas en los jardines de Murcia: *Metrosideros*, *Melaleuca* y *Callistemon*.

En muchos casos Codorníu aporta en la Guía valores estéticos, apreciaciones subjetivas, sentimientos, producidos por la vegetación o por su disposición en el Parque.

6. Momentos del Parque

No pasó un año desde su inauguración para que la ciudad lo escoja como marco de un nuevo evento en carnavales, la batalla de confetis y serpentinas del Domingo de Piñata que comenzó a celebrarse en el Parque el 28 de febrero de 1909.

Después de la acontecida en 1911 la prensa [7] se vuelca en alabanzas al Parque detectándose la aceptación que este encuentra en la ciudad aun considerando que se encuentra en un estadio juvenil: “*La atracción del Parque ayer, fue el mismo Parque. La gente lo disfrutó. Recorrió todos sus paseos, los de un lado ó otro de la pista de carruajes; apreció el crecimiento de los árboles y su estado de pronta floración, como así mismo la pureza del ambiente en que no se notaba un átomo de polvo*”.

El Parque sujeto a los periodos cíclicos de la economía sufrirá una época de abandono que se hace patente durante 1926. La prensa titula *"Lastimoso estado del Parque"* [8] y reclama la intervención prometida por el concejal Andrés Sobejano, que asesorándose por fotografías y postales de los jardines y paseos ornamentados con arreglo a las exigencias modernas, aspira a reformar los jardines y ponerlos a la altura de las primeras poblaciones españolas

El periodo de Guerra Civil dejó sus consecuencias en el abandono del Parque.

En 1941 se presentó un proyecto para elevar la entrada actual del Parque hasta el mismo nivel de la avenida Teniente Flomesta, formando una gran plaza frente a la puerta del Instituto. Desde la plaza se descendería al Parque por dos amplias escalinatas separadas por el paseo de carruajes [9], aunque solo se hizo la escalinata de la izquierda. Además se instala una balaustrada sobre el pretil del muro en el tramo hasta el Puente Nuevo.

A principios de 1952 se recogen las primeras noticias para un nuevo encauzamiento del río, que se repetirán a lo largo del año, y que lleva consigo la desaparición del Parque [10]. A finales de año se publicará en la prensa un avance del proyecto de canalización y el 12 de abril del siguiente, en el mismo periódico se dan detalles de las obras. El Segura, como si quisiera desembarazarse del Parque, descarga en octubre dos avenidas en menos de 24 horas y en junio de 1955 el Parque se cierra definitivamente para el comienzo de las obras.

7. Referencias bibliográficas

- [1] Codorniú R. 1915. Guía del Parque de Ruiz-Hidalgo en Murcia. Ed: Imprenta Alemana. Madrid.
- [2] El Liberal de Murcia, 23 de febrero de 1908.
- [3] Sánchez Gullón E., Caraballo Martínez J.M., Ruíz, F. 2009. Los arboretos de eucaliptos históricos de Huelva. Boteloua 6: 115-133.
- [4] Codorniú R. 1912. Hojas Forestales. Ed: Imprenta Alemana. Madrid.
- [5] Codorniú R. 1918. Bagatelas Forestales 1916-18. Ed: Imprenta Alemana. Madrid.

[6] Codorniú R. 1920. Hojas Forestales. Ed: Sociedad Española de Artes Gráficas. Madrid.

[7] El Liberal de Murcia, 6 de marzo de 1911.

[8] El Liberal de Murcia, 13 febrero de 1926.

[9] La Verdad de Murcia, 5 de enero 1941.

[10] La Verdad de Murcia, 9 de agosto 1952.

Figuras



Figura 1. Los Eucaliptos del Parque. Antonio Medina Bardón. 1943.



Figura 2. Vista del Parque y su relación con la ciudad. Cartomur (1929).

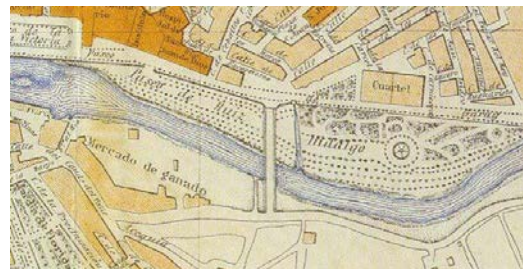


Figura 3. Representación basada en el plano de García Faria. Aproximadamente 1910.

The inorganic part of green roof substrates impacts differently on the growth of two Mediterranean plant species

S. Ondoño⁽¹⁾, J.J. Martínez-Sánchez⁽²⁾, J.L. Moreno⁽¹⁾

⁽¹⁾ Grupo de Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Campus Universitario de Espinardo, Aptdo. de correos 164, Espinardo, 30100 Murcia, (Spain). Tel.: +34 968396259. sotovar@cebas.csic.es

⁽²⁾ Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, CP 30203 Cartagena, Murcia, (Spain).

Resumen

Los sustratos para cubiertas verdes deben reunir una serie de propiedades fisicoquímicas y nutricionales para poder ser usados como base para el desarrollo vegetal. El impacto de diversas dosis de materia orgánica así como del espesor del sustrato son factores ampliamente estudiados en este tipo de cubiertas. Sin embargo, el efecto de la parte inorgánica del sustrato sobre el crecimiento vegetal en este tipo de cubiertas no ha sido ampliamente estudiado. Para ello, se diseñaron cuatro sustratos compuestos por un 10% en volumen de compost mezclado con diversos materiales inorgánicos. Estas mezclas se dispusieron en mesas de cultivo con un espesor de 10 cm. En ellos, se sembraron dos especies vegetales típicas de la zona Mediterránea: *Lotus creticus* L. y *Asteriscus maritimus* L. Con el fin de estudiar la evolución de cada sustrato, se realizó un estudio de las propiedades fisicoquímicas, y nutricionales de cada sustrato. Se observaron mayores niveles de nutrientes en las mezclas con suelo que en aquellas que no lo presentaban (CB y CsB). Los resultados sugieren que una dosis de compost del 10% es capaz de mantener un aceptable desarrollo de ambas especies, aunque su comportamiento varía en función de la composición del sustrato.

Palabras clave: compost; arena de sílice, ladrillo triturado, *Lotus creticus*, *Asteriscus maritimus*.

Abstract

Extensive green roofs substrates should meet a list of physicochemical and nutritional requirements to be used as a basis for plant growth. In recent years, the impact of different organic matter doses and the substrate depth on plant growth have been studied although little is known about the effect of the inorganic component of these substrates on plant development in Mediterranean green roof systems. Four substrates were made by mixing the same compost, at 10% by volume, with different inorganic materials. These were placed, with a depth of 10 cm on cultivation tables. Two endemic species were sown in each substrate: *Lotus creticus* L. and *Asteriscus maritimus* L. Physicochemical and nutritional properties of the substrates as well as the plant development were evaluated. We observed high levels of C and N in the soil-containing substrates than in the soilless ones (CB and CsB mixtures). The results suggest that a compost dose of 10% was able to maintain acceptable plant growth, but a different pattern was observed depending on the inorganic composition of the substrate.

Palabras clave: compost; silica sand; crushed bricks; *Lotus creticus*; *Asteriscus maritimus*.

1. Introduction

The Mediterranean region is being deeply affected by the desertification process which leads to the appearance of desert conditions [1]. Consequently, the implementation of green roof technology in Mediterranean cities could help us to reduce the ecological footprint in large cities. Because of the Mediterranean climate conditions (low rainfall, high temperatures in summer and low in winter), green roof design has been influenced; hence, new considerations about substrate characteristics and the plant species

used are emerging. The use of drought tolerant species is an appropriate alternative to the typical use of Crassulacean species (*Sedum* spp.). In this sense, the use of native species may be of interest due to their characteristics and potential ability to adapt to adverse conditions [2].

As far as substrate design is concerned, there are several works focused on the study of the best artificial substrate combination, which should meet all the physical and chemical requirements to assure the plant growth [3,4]. Most of these papers evaluated the effect of the substrate depth, the organic matter dose, and the amount

of irrigation supplied on the subsequent plant development. Regarding the substrate depth, there is a general consensus that deeper substrates promote plant growth, [5,6]. In this sense, higher compost dose will improve the chemical and microbiological properties of the substrate, thus increasing plant growth [6,7,8]. On the other hand, the FLL guidelines [9] strongly recommend that the organic matter content of a green roof medium should not be higher than 20% by volume, in order to avoid future problems derived from an excess of nutrients. Therefore, the use of low organic matter content reduces the maintenance requirements due to the presence of smaller plants and less weed invasion. It is important to seek equilibrium between the organic matter dose and the subsequent plant growth. However, plant growth responses to the inorganic components in growing media are frequently not considered within studies of green roof vegetation [6,7]. We aimed to study how different combinations of inorganic materials with the same compost type and dose would impact the physicochemical and biochemical substrate properties, as well as the plant growth.

2. Materials and methods

2.1. Substrates, plant species, and irrigation conditions

We tested four different mixtures of organic and inorganic materials; compost mixed with silica sand and crushed bricks in 1:1:8 volumetric proportions (CsB), the same compost mixed only with crushed bricks (CB) in a 1:9 volumetric ratio, the compost mixed with a clay-loam soil and crushed bricks (CSB) (1:1:8; v:v:v), and another mixture made of compost, silica sand, and the clay-loam soil (CsS) (1:1:8; v:v:v). All the mixtures had the same compost type and dose. The compost, made from sheep and goat manure mixed with green wastes (plant prunings and debris). The soil is classified as a Haplic calcisol (FAO-ISRIC and ISSS, 1998) sampled in Santomera (Murcia). The silica sand had a diameter of 0.6 mm and was supplied by a local factory. The crushed bricks came from construction industry residues (4-12 mm diameter).

The two plant species tested in the above mentioned substrates were *Lotus creticus* L. and *Asteriscus maritimus* L. Both species are typical of the Mediterranean semi-arid region. Seeds of both plant species were sown in each substrate in November-2013, using a planting framework

of 5 x 5 cm. Each substrate type was prepared in triplicate for each species, at a depth of 10 cm. For this, we used three cultivation tables, each with dimensions of 3 x 1.5 m. Each cultivation table was composed of eight experimental units, measuring 0.75 x 0.75 x 0.20 m (length, width, and height). These cultivation tables were connected to an irrigation controller which was scheduled on a weekly basis. In this sense, we decided to adjust the irrigation to the average K_c of the two species, which corresponds to approximately 40% of the ET_0 .

2.2. Substrate analysis

The water holding capacity (WHC) was measured, in triplicate, in 100-ml-capacity metallic cylinders. In the same cylinders, the permanent wilting point (PWP) was measured using a bar pressure-plate extractor at -1500 kPa of vacuum pressure. By knowing both the WHC and the PWP we can estimate the available water capacity (AWC), as the difference between the WHC and the PWP. The bulk density was determined for each substrate by weighing the measured volume (100 cm³) in the metallic cylinders. The real density and porosity were calculated using the equations of Inbar et al. [10]. The electrical conductivity (EC) and pH were measured in a 1:20 (w:v) aqueous extracts.

In order to test the nutrient content in each substrate and its evolution over time, we took samples of each substrate at the beginning (T_0) and end of the experiment (T_F). The initial sampling was carried out before the sowing, and T_F was 10 months after T_0 . At both sampling times, the contents of total carbon (TC), total organic carbon (TOC), and total nitrogen (TN) were measured in dry, solid samples of each substrate, using an Elemental Analyser (C/N Flash EA 1112 Series-Leco Truspec).

2.3. Plant development

Plant cover was measured by digital image analysis, using a digital camera and RSI ENVI 4.0 software to process the images. The photos were taken fortnightly or monthly during the 10-month duration of the experiment (from November-2013 to August-2014). In order to obtain more information about the plant development in each plot, we estimated the plant density - which expresses the number of plants per substrate surface (0.56 m²).

3. Results and Discussion

All the mixtures had a pH around 9, and the EC was higher in the CB and CSB mixtures. Meanwhile, the CsB and CsS mixtures possessed greater WHC and AWC for plant growth, but had low porosity and high density in comparison to the other mixtures (Table 1). According to these data, there was a clear relationship between the high WHC of the ternary mixtures - especially CsB and CsS - and their constituent materials. In this regard, the most porous mixtures were also the lightest; both are necessary in a plant substrate intended for use in green roof systems [11,12].

The C and N content in each substrate was higher in the CSB and CsS mixtures than in the rest of the mixtures, although great amounts of TOC also accumulated in the CsB substrate under *L. creticus* plots. In contrast, the CB substrate underwent C and N losses with respect to the starting values. In this regard, the soil-based substrates had greater TC, TOC, and TN contents than the soilless mixtures. The substrate CsS was the most effective in terms of C and N sequestration (Table 2), reaching 1.06 kg TC m⁻² under *A. maritimus* as well as 352.96 g TOC m⁻² and 55.31 g TN m⁻² under *L. creticus* during an assay period of 10 months.

Regarding the plant growth, although the germination rates were low (below 15%; data not shown) due to the high density of seeding, we obtained high values of plant density (Table 3). In general, *L. creticus* showed greater plant cover on a specific substrate (CsB) than *A. maritimus*, but the latter species had almost the same cover on every substrate at the end of the assay. Therefore, *L. creticus* thrives better in more heterogeneous mixtures, in which the presence of sand and bricks leads to higher porosity and aeration for the development of the roots. Contrarily, *A. maritimus* had greater development in the mixtures CB and CSB, also growing properly in the CsS mixture at the end of the summer. Although the cover by substrate area was lower for *A. maritimus* than for *L. creticus* at the end of the assay, *A. maritimus* experienced similar development in every substrate (Table 2) - suggesting that it is a more versatile species.

4. Conclusions

This study has shown that a compost dose of 10% was enough to host and maintain the plant species tested and, although we did not obtain great plant cover, the plant density per plot was elevated in almost every substrate.

Comparing the substrates tested, the CsB mixture showed acceptable physicochemical properties but also significant decreases in the C and N contents relative to the initial values. The CB mixture was the least suitable from every point of view. On the contrary, the CSB and CsS substrates were the most appropriate with regard to promotion of the *A. maritimus* growth - whereas the *L. creticus* development was enhanced primarily in the CsB mixture.

As far as the nutrient content in each substrate, the CSB and CsS mixtures were able to sequester higher amounts of C and N. Thereby, both substrates are able to act as a carbon sink in a green roof. From a more physical point of view, the soil- and the sand-containing mixtures (CsB, CSB, and CsS) can provide rainfall storage because of their high WHC and porosity. However, the CsS substrate did not accomplish the physical requirements that every green roof substrate should meet according to the FLL guidelines (2010) [9]: high porosity, good aeration, low density, and heterogeneous particle size distribution.

Finally, the plant species selected are good candidates to be introduced in green roof systems located in Mediterranean cities because both are perfectly adapted for growth under harsh weather conditions with little irrigation and low organic matter inputs.

5. Acknowledgments

We thank the INNPACTO project (IPT-2011-1017-310000) for the financial support. Authors are grateful to the Department of "Ingeniería Agromónica y del Mar" of the Polytechnic University of Cartagena for their assistance with the RSI ENVI 4.0 software.

6. Referencias bibliográficas

- [1] PNUMA. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 1997.
- [2] Franco, J.A., Martínez-Sánchez, J.J., Fernández, J.A., Bañón, S. Selection and nursery production of ornamental plants for landscaping and xerogardening in semi-arid environments. *J. Hort. Sci. Biotech.* 2006; 81:3-17.
- [3] Kotsiris, G., Nektarios, P.A., Paraskevopoulou, A.T. *Lavandula angustifolia* growth and physiology is affected by substrate type and depth when grown under Mediterranean semi-intensive green roof conditions. *HortScience.* 2002; 47:311-317.

[4] Molineux, C.J., Fentiman, C.H., Gange, A.C. Characterizing alternative recycled waste materials for use as green roof growing media in the UK. *Ecol. Eng.* 2009; 35: 1507-1513.

[5] Rowe, D.B. Getter, K.L., Durhman, A.K. Effect of green roof media depth on Crassulacean plant succession over seven years. *Landscape Urban Plan.* 2012; 104:310-319.

[6] Graceson, A., Monaghan, J., Hall, N., Hare, M. Plant growth responses to different growing media for green roofs. *Ecol. Eng.* 2014; 69:196-200.

[7] Olszewski, M. W., Holmes, M. H., Young, C. A. Assessment of physical properties and stoncrop growth in green roof substrates amended with compost and hydrogel. *Hortscience* 2010; 45:482-482.

[8] Ondoño, S., Bastida, F., Moreno, J.L. Microbiological and biochemical properties of artificial substrates: A preliminary study of its application as Technosols or as a basis in Green Roof Systems. *Ecol. Eng.* 2014; 70:189-199.

[9] FLL guidelines. Guide for planning, execution and unkeep of green-roof sites. Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e.V. Bonn. Germany. 2010.

	CsB-L	CsB-A	CB-L	CB-A	CSB-L	CSB-A	CsS-L	CsS-A
TC	348.05 e (8.93)	27.87 c (0.39)	- 1234.82 a (56.22)	- 871.74 b (23.44)	163.39 d (8.60)	479.57 f (15.13)	743.15 g (32.36)	1063.83 h (61.01)
TOC	247.69 e (0.56)	-77.12 c (4.86)	-613.41 a (21.32)	-438.70 b (3.85)	83.51 d (9.87)	310.51 f (0.71)	185.57 g (18.57)	29.67 h (2.67)
TN	6.23 d (0.36)	5.77 d (0.25)	-52.02 a (2.28)	-39.87 b (1.65)	-10.29 c (6.83)	54.85 f (2.83)	55.31 g (2.83)	40.85 e (8.39)

[10] Inbar, Y., Hadar, Y., Chen, Y. Recycling of cattle manure - the composting process and characterization of maturity. *J. Environ. Qual.* 1993; 22:857-863.

[11] Beattie, D.J., Berghage, R.D. Green roof media characteristics: The basics, p. 411-416. In: Proc. of 2nd North American Green Roof Conference: Greening Rooftops for Sustainable Communities, Portland, OR, 2 – 4 June 2004. The Cardinal Group, Toronto, Canada.

2] Dunnett, N., Kingsbury, N. Planting green roofs and living walls. 2nd Ed. Timber Press, Cambridge, UK; 2010.

Tables

Table 1. Physicochemical substrate characteristics. Values in parenthesis represent standard deviations.

	(CsB 1:1:8)	(CB 1:9)	(CSB 1:1:8)	(CsS 1:1:8)
pH^a	9.13 (0.13)	9.08 (0.08)	8.89 (0.10)	8.86 (0.12)
EC^a (μS cm ⁻¹)	255 (0.04)	662 (0.01)	633 (0.05)	316 (0.01)
WHC (%)	33.05 (1.09)	28.07 (1.78)	28.68 (1.20)	44.27 (0.05)
PWP (%)	16.85	17.28	20.15	23.74
AWC^b (%)	16.20	11.04	8.53	20.53
Bulk density (g cm ⁻³)	1.004	0.828	0.866	1.061
Particle density^c (g cm ⁻³)	2.564	2.560	2.564	2.533
Porosity^d (%)	60.85	67.71	66.20	58.20

Table 2. Carbon and nitrogen sequestration potential by each substrate. Substrates followed by the same letters do not present significant differences (p<0.05) according to the Tukey-b test. Values in parentheses represent standard deviations.

Table 3. Plant development measured in each substrate throughout the experiment. For each sampling time, substrates followed by the same letter do not present significant differences (p<0.05) according to the Tukey-b test.

Substrate	% Plant Cover				Plant density (n° plants/plot)			
	April	May	July	Aug	April	May	July	Aug
CsD-L	4.13 b	17.35 d	19.69 d	24.24 e	9.30 b	39.04 d	44.30 d	54.53 e
CsB-A	13.14 e	12.88 c	12.03 b	13.93 b	29.56 e	29 c	27.08 b	31.34 b
CB-L	2.38 a	3.45 ab	12 b	16.95 cd	5.37 a	7.76 ab	27.03 b	38.13cd
CB-A	23.65 f	22.46 e	15.39 c	13.54 b	53.23 f	50.53 e	34.63 c	30.47 b
CSB-L	5.56 c	4.83 b	12.86 b	15.73 c	12.50 c	10.87 b	28.94 b	35.39 c
CSD-A	6.43 c	15.35 d	21.14 d	16.76 cd	14.47 c	34.54 d	47.57 d	37.73 cd
CsS-L	1.69 a	1.58 a	6.48 a	9.38 a	3.82 a	3.56 a	14.58 a	21.12 a
CsS-A	9.16 d	16.74 d	13.72 bc	18.54 d	20.63 d	37.67 d	30.86bc	41.72 d

Irrigation scheduling and regulated deficit irrigation in stone fruits

F. Pérez-Sarmiento, O. Mounzer, E. Nicolás

Departamento de Riego. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Apdo. 164. 30100 Espinardo (Murcia). España. frperez.sarmiento@gmail.com

Abstract

In recent years the interest for applying irrigation techniques aiming to reduce water consumption has increased, mainly in areas with scarce water resources. We studied the effect of different regulated deficit irrigation (RDI) strategies on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch cv. "Catherine") performance in Murcia (SE Spain) during three consecutive growing seasons. Three irrigation strategies were established: a control treatment, irrigated to fully satisfy the crop water requirements and two RDI treatments (moderate and severe) based on measurements of stem water potential (Ψ_s). Pruning weight, percentage of fruit categories, fruit diameter, crop load and yield were determined for each treatment. The results indicated that RDI treatments significantly reduced pruning weight. However, no significant differences were detected in terms of reproductive growth, fruit categories and yield. In the case of water productivity, the values for the RDI treatments were higher than those from the control. These results and water savings up to 50% indicate that RDI strategies constitute a possible solution against water shortages in areas such as the south-eastern region of Spain, although sustainability must be studied in the medium-long term.

Keywords: Stem water potential; Soil water content; *Prunus persica*; Yield

1. Introduction

Mediterranean regions are characterized by the shortage on water resources. This situation is aggravated by the strong competition for water between agriculture and other non-agricultural users like industry or increasing population. Consequently, new and precise tools for assessing crop water requirements are needed to cope with this water scarcity. One of the most promising techniques to attain this objective is the use of Regulated Deficit Irrigation (RDI). This technique consists of applying water in quantities below those necessary to satisfy crop evapotranspiration (ET_c) requirements during certain periods of the crop cycle when production and crop quality are hardly affected, applying all the water needed during the rest of the cycle. Currently, Spain is the second largest producer of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. Most peach tree plantations are located in the Mediterranean area. In particular, the Murcia Region ranks third in peach production in Spain, with an average annual yield for the last 5 years of about 246,500 t, approximately 20% of the Spanish total production [3].

Several studies have reported that stem water potential (Ψ_s) is more reliable than others indicators of water needs. For these reasons, the aim of this study was to evaluate the effect of different RDI strategies based on Ψ_s

measurements on production in adult peach trees [*Prunus persica* (L.) Batsch cv "Catherine"] under Mediterranean conditions.

2. Materials and Methods

The experiment was conducted over three consecutive years (2008–2010) in a commercial orchard located in Murcia. The irrigation water was considered of good quality with a very low electrical conductivity (0.6 dS m⁻¹). Plant material consisted of peach trees (*Prunus persica* (L.) Batsch cv. 'Catherine') grafted on GF-677 rootstock, planted in 1999. Spacings were 4 m x 6 m. Trees were drip irrigated using three emitters per tree (4 L h⁻¹). The experiment was laid out in completely randomized blocks with 4 replications (16 trees each). Three irrigation treatments were established (Fig. 1): Control plants (treatment C) were daily irrigated above the estimated crop evapotranspiration in order to obtain non-limiting soil water conditions, and two RDI strategies: RDI I plants were irrigated to maintain Ψ_s values close to -1.5 MPa during stage II of fruit growth and postharvest, and RDI II plants were irrigated to maintain Ψ_s values close to -1.8 MPa at stage II of fruit growth and -2.0 MPa at postharvest.

The volumetric soil water content (θ_v) was measured using a neutron probe. Midday stem

water potential (Ψ_s) was measured using a pressure chamber following the procedures described by [7]. Fruit diameter was measured perpendicularly to the fruit suture. Fruits from each tree were individually harvested according to market demands. The effect of the irrigation treatments on fruit size was studied evaluating marketable and non marketable production, according to Commission Regulation (EC) nº 1861/2004.

3. Results and Discussion

The amounts of water applied (Fig. 2A) compared to ETc gave rise to savings of 26-45 % in 2008, 49-55 % in 2009 and 64-65 % in 2010 for RDI I and RDI II treatments, respectively.

The average soil water content in the 0-1m layer during each growth stage is shown in Table 1. In the C treatment, θ_v remained close to field capacity over the three years of experiment, indicating that plants did not suffer from water deprivation. On the contrary, significant differences were observed among treatments during stage II and postharvest, RDI values being lower than those of C treatment especially during postharvest (summer period with high climatic demand).

An increase in the evaporative demand from May produced a decrease in Ψ_s , with a similar pattern for the three irrigation treatments, although of different intensity (Fig. 2B). In fact, Ψ_s values for control trees decreased from an initial value of -0.5 MPa (stage I) to -0.9 MPa (postharvest). The RDI treatments induced significant reductions in Ψ_s in all the stages during which water deficit was imposed. Water deprivation during postharvest did not negatively affect the following year production of the studied peach trees, suggesting the feasibility to save water during this period. During the stage I and stage III of fruit development the values of Ψ_s were very similar among treatments. This scheduling had a negative effect on vegetative growth as shown in figure 3 (Pruning weight).

Our results showed that RDI treatments reduced vegetative growth (pruning weight) compared to trees under full irrigation conditions, similarly to what has been previously reported [1], thus demonstrating the high sensitivity of peach vegetative growth to water deficit [4]. In contrast, the stress imposed did not cause any significant reduction in fruit growth (Fig. 4). According to [6], fruits act as sinks for photosynthates that help a faster recovery

during the periods of full irrigation. The irrigation treatments had no significant effects on crop load and yield (Table 2).

With respect to fruit size, water stress did not result in significant differences in fruit category (Fig. 5) in contradiction to the findings of [2] for the same cultivar. The peach trees with high load fruit have proven to be more sensitive to water stress than trees with low loads [7]. In our case, in 2009 the industrial destination of the fruit allowed a minor thinning which caused a higher crop load in this year respect to that of 2008 and 2010. During that year, Ψ_s values were lower compared to those from other years with a lower crop load. This effect of water deprivation on fruit growth did not limit subsequent crop yield, most of the fruits reaching marketable fruit size.

4. Conclusions

The results obtained suggest that the RDI treatments were able to considerably reduce the seasonal water applied without affecting yield components of peach trees. The RDI treatments tested, showed significant differences regarding vegetative growth, but these differences were not found in the yield of both crops. Nevertheless, sustainability of these results must be studied at the medium-long term. The reduction of tree size can be considered beneficial because it allows light to enter inside the tree canopy and also reduces pruning time, with the consequent economic savings for the farmer. These reasons, together with irrigation water savings around 50%, emphasize the RDI strategies as a possible solution in areas with water shortage, like the south-eastern region of Spain.

5. Acknowledgements

This study was supported by CONSOLIDER INGENIO 2010 (MEC CSD2006-0067).

6. References

- [1] Abrisqueta I., Tapia L.M., Conejero W., Sanchez-Toribio M.I., Abrisqueta J.M., Vera J., Ruiz-Sanchez M.C., 2010. Response of early-peach [*Prunus persica* (L.)] trees to deficit irrigation. Spanish Journal of Agricultural Research 2010 8(S2), S30-S39

[2] Alcobendas R., Mirás-Ávalos JM., Alarcón JJ., Nicolás E., 2013. Effects of irrigation and fruit position on size, colour, firmness and sugar contents of fruits in a mid-late maturing peach cultivar. *Sci Hortic* 164, 340-347.

[3] Anuario estadístico de la región de Murcia, 2010. Available in: <http://www.carm.es/econet/anuario/actual/anuario.html>. [October 2011] (In Spanish).

[4] Bradford KJ., Hsiao TC., 1982. Physiological responses to moderate water stress. In: Lange OL.; Nobel PS.; Osmond CB., Ziegler H. (eds.) *Physiological Plant Ecology II. Water relations and carbon assimilation*. *Encycl. Plant Physiology* vol 12B, Berlin, Springer-Verlag, 1982. p.264-324. v.12B.

[5] Shackel KA, Buchner RP, Connell JH, Edstrom JP, Fulton AE, Holtz BA., Lampinen BD., Reil RO., Stewart WL., Viveros MA., 2010. Midday stem water potential as a basis for irrigation scheduling. 5th National Decennial Irrigation Conference Proceedings, 5-8 December 2010, Phoenix Convention Center, Phoenix, Arizona USA IRR10 9993.(doi:10.13031/2013.35841).

[6] Torrecillas A., Domingo R., Galego R., Ruiz-Sánchez MC., 2000. Apricot tree response to irrigation with holding at different phenological periods. *Sci Hort* 85, 201-215.

[7] Turner, NC. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* (58):339-366.

Tables and Figures

Table 1. Average soil water volumetric content in different stages of fruit growth for the three studied growing seasons. Each data point is the mean of all values in the corresponding stage. Different letters next to a value in each year indicate significant differences according to Tukey's multiple range test ($p < 0.05$).

	Stage I	Stage II	Stage III	Post-Harvest
2008				
C	0.24a	0.25a	0.25a	0.25a
RDI I	0.25a	0.22b	0.25a	0.20b
RDI II	0.24a	0.20b	0.24a	0.17c
2009				
C	0.26a	0.25a	0.26a	0.25a
RDI I	0.26a	0.21b	0.26a	0.19b
RDI II	0.24a	0.18c	0.25a	0.17c
2010				
C	0.25a	0.24a	0.24a	0.25a
RDI I	0.25a	0.22b	0.24a	0.19b

Table 2. Crop load (number of fruits tree⁻¹), yield (kg tree⁻¹) and water productivity (WP, kg m⁻³) for the experimental period 2008-2010. Different letters next to a value in each year indicate significant differences according to Tukey's multiple range test ($p < 0.05$).

	Crop load (Fruits tree ⁻¹)	Yield (Kg tree ⁻¹)	WP (Kg m ⁻³)
2008			
C	170a	29.87a	1.29a
RDI I	137a	26.99a	2.47ab
RDI II	160a	29.78a	3.75b
2009			
C	489a	67.23a	3.30a
RDI I	523a	66.54a	9.73b
RDI II	488a	63.18a	10.63b
2010			
C	173a	30.16a	1.77a
RDI I	197a	33.79a	6.61b
RDI II	244a	40.40a	8.15b

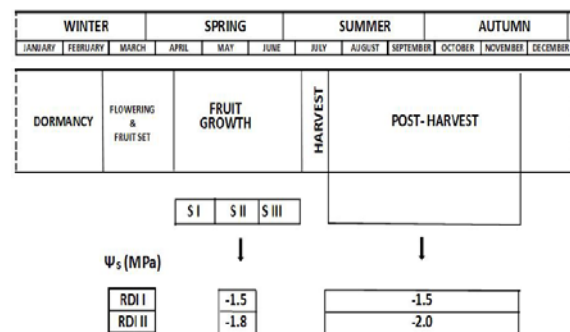


Fig. 1. Regulated deficit irrigation strategies based on threshold values for midday stem water potential (Ψ_s), applied in stage II (S II) of fruit growth and postharvest.

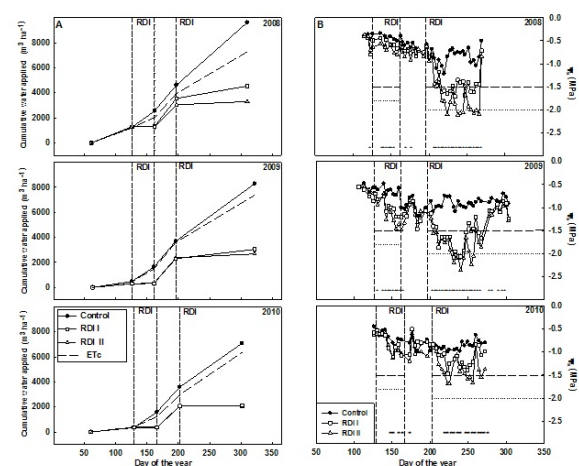


Fig. 2. Cumulative applied water and Etc (A) and midday stem water potential (B), in C (closed circles), RDI I (open squares) and RDI II (open triangles) plants for the three studied growing

seasons. Asterisks indicate significant differences among treatments ($p < 0.05$). The interval between vertical lines, from left to right, represents the beginning of stages II and III of fruit growth and postharvest. Horizontal lines represent threshold values in each phenological stage for both RDI treatments.

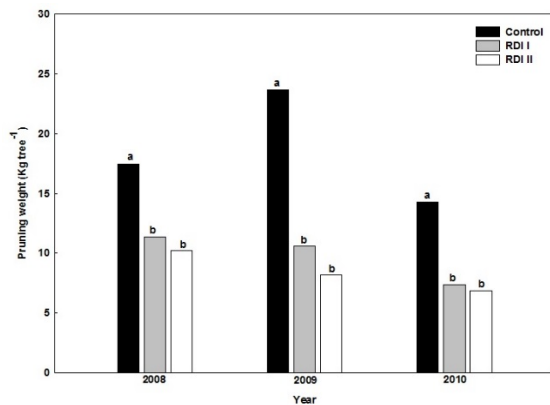


Fig. 3. Pruning weight as a function of the irrigation treatment, control (black bars), RDI I (gray bars) and RDI II (white bars) in the 2008, 2009 and 2010 growing cycles. Each bar corresponds to the mean of sixteen trees. Different letters on top of bars indicate significant differences according to Tukey's multiple range test ($p < 0.05$).

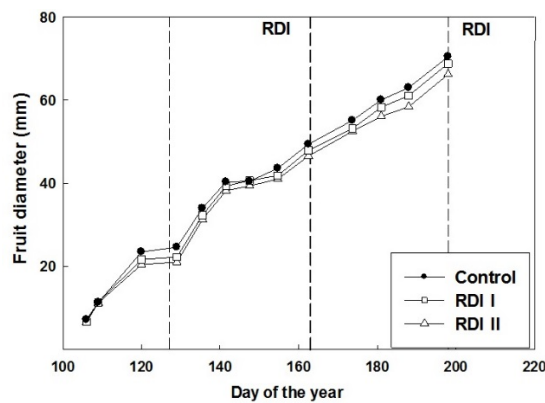


Fig. 4. Fruit diameter (mm) evolution in C (closed circles), RDI I (open squares) and RDI II (open triangles) plants for the average of the three studied growing seasons. The interval between vertical lines, from left to right, represents the beginning of stages II and III of fruit growth and postharvest. Horizontal lines represent threshold values in each phenological stage for both RDI treatments.

triangles) plants for the average of the three studied growing seasons. The interval between vertical lines, from left to right, represents the beginning of stages II and III of fruit growth and postharvest. Each value is the mean of 160 measurements.

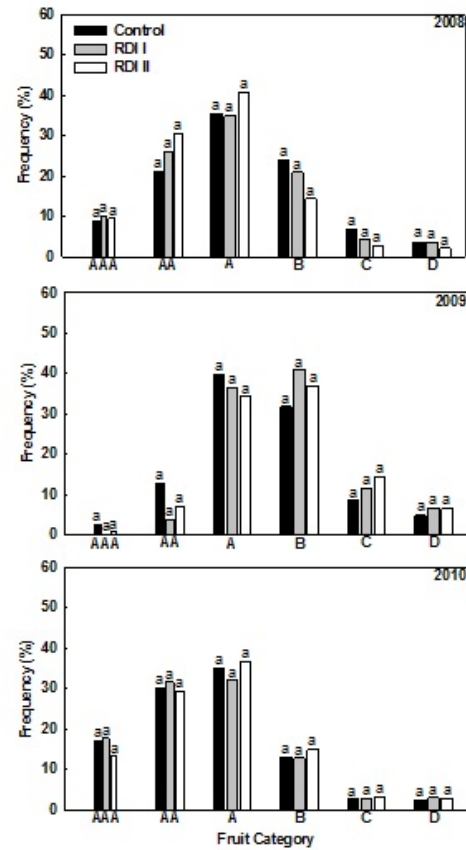


Fig. 5. Percentage of fruit categories for each irrigation treatment, control (black bars), RDI I (gray bars) and RDI II (white bars) in the 2008, 2009 and 2010 growing cycles. Each bar corresponds to the mean of eight trees. Different letters on top of bars indicate significant differences according to Tukey's multiple range test ($p < 0.05$).

Waste management and contaminated soil from metal mining: technical aspects, environmental and regulatory framework

M.G. Rosique-López⁽¹⁾, G. García-Fernández⁽²⁾

⁽¹⁾ Plaza de Castellini nº 5, planta 1, 30201Cartagena.E-mail: guadalupe.rosique@gmail.com

⁽²⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30204 Cartagena (Murcia), España.

Resumen

El suelo es un recurso afectado por fuentes de contaminación que lo pueden convertir en un recurso contaminado. El contenido en metales pesados del suelo es uno de los criterios empleados para la estimación de la calidad ambiental del suelo, siendo necesario, el establecimiento de niveles de fondo en los metales y sus correspondientes niveles genéricos de referencia. El suelo tiene unos valores naturales de presencia de determinados elementos traza, metales, que son los valores de fondo, que generan un riesgo admisible. Pero cuando ese riesgo se convierte en inadmisibles, se han de establecer otros valores. Estos valores serían los niveles genéricos de referencia del suelo, y son los valores que nos indicarán si estamos ante un suelo potencialmente contaminado, o contaminado. Los "elementos traza" aparecen mayoritariamente en los residuos mineros relativos a las industrias extractivas. Estos materiales ya sean residuos, recursos o subproductos reciben, por lo general, el tratamiento de residuos inertes, cuando en realidad deberían ser tratados como residuos peligrosos. El presente estudio critica las disposiciones normativas que regulan los residuos y suelos propios de los distritos de minería metálica, con la finalidad de proponer mejoras normativas que permitan la adecuación de la legislación aplicable a los nuevos conocimientos científico-técnicos.

Palabras clave: toxicidad; consideración jurídica; elementos traza (metales); minimización de riesgos; salud ambiental.

Abstract

Soil is a resource affected by sources of pollution that can become contaminated resource. The heavy metal content of the soil is one of the criteria for estimating the environmental quality of the soil, being necessary to establish background levels in metals and their corresponding levels generic de reference. The floor has natural presence values of certain trace elements, metals, which are the background values, which generate an acceptable risk. But when that risk becomes unacceptable, they have to set other values. These values would be the generic reference levels of soil, and are the values that will tell us if this is a potentially contaminated or contaminated soil. The "trace elements" appear mostly in mining waste relating to extractive industries. These materials either waste resources or byproducts are, in general, the treatment of inert waste, when they should be treated as hazardous waste. This study criticizes the regulatory provisions governing waste and soils own metal mining districts, in order to propose improvements regulations that facilitate adjustment of the legislation applicable to new scientific and technical knowledge.

Keywords: toxicity, legal status, trace (metal) elements; risk minimization, environmental health.

1. Introducción

Esta investigación parte de la idea de que España es un país que no se ha caracterizado históricamente por su concienciación en la necesidad de proteger el suelo. A este respecto, la consideración de residuo en la legislación tanto a nivel comunitario, como estatal se basa en definiciones poco claras y de difícil comprensión. En consecuencia, elaboramos un estudio de la normativa existente relativa a suelos contaminados y residuos mineros, tanto a nivel comunitario, estatal y de comunidades autónomas, así como la consulta de Jurisprudencia relativa a este tema. Por otro lado, también se hace un estudio de los artículos

científicos publicados relativos tanto de suelos contaminados como de residuos mineros. Por último, y a modo de corolario, a la luz de las carencias técnicas y jurídicas que se han puesto de manifiesto tras el estudio y análisis de la legislación actual, se propone que dichas carencias sean tenidas en cuenta para futuras disposiciones normativas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Los materiales utilizados para este trabajo han consistido en la búsqueda y estudio de

bibliografía en todo lo relativo a artículos publicados sobre suelos contaminados y residuos mineros. Igualmente, se ha recurrido al análisis de las disposiciones normativas relativo a los residuos mineros y suelos contaminados.

2.2 Métodos

El análisis comparado entre los conocimientos científico-técnicos, la Jurisprudencia y las disposiciones normativas, relativos a suelos contaminados y residuos mineros, ha sido la base de este trabajo. De este modo, se han intentado localizar las carencias normativas existentes en la legislación aplicable actualmente, en relación a su poca adecuación respecto de las características y comportamiento de los suelos y residuos de zonas de minería, conforme a los conocimientos científicos y técnicos actualmente disponibles. Para ello, en todo momento, se ha tenido como prioridad la minimización de los riesgos para la salud ambiental del entorno de estas zonas mineras, así como la valorización de estos residuos como posible fuente de recursos.

3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos se han derivado de la revisión de las fuentes referidas en el apartado anterior, en materia de industrias extractivas, Ley de Minas y Reales Decretos 975/2009 y 777/2012 relativas a la protección y rehabilitación de espacios mineros y de residuos y suelos contaminados (Ley 22/2011). La consideración de un suelo contaminado debe tener en cuenta los valores de fondo, que es el contenido natural de metales propios de cada región edafogeológica, así como los niveles genéricos de referencia (NGR) [1,2], que se definen para cada sustancia como la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que no conlleva un riesgo superior al máximo aceptable para la salud humana o los ecosistemas. Estos niveles genéricos de referencia se calculan de acuerdo con los criterios recogidos en el anexo VII del Real Decreto 9/2005, y los mismos nos permiten la elaboración de riesgos de esa toxicidad por la exposición hasta que los valores de 100xNGR, a partir de los cuales se consideran ambientes totalmente, contaminados. El intervalo entre los niveles de fondo y los NGR, constituye el rango de concentración de estos elementos que conlleva un riesgo admisible para la población y o ecosistemas. Los NGR están regulados por normativa internacional y de comunidades autónomas. A nivel nacional, no se dispone de normativa al respecto, si bien el Real

Decreto 1310/1990, que regula los lodos de depuración del sector agrícola, fija los niveles máximos en suelos y lodos para algunos metales pesados y elementos traza, tales como son el Zn, Pb, Cu, Co y As. Lo importante, por tanto, es la forma en la que el material se acaba clasificando, ya sea como residuo inerte o como residuo peligroso. En el primer caso, estos residuos no necesitarían de un tratamiento específico, mientras que si se considera como residuo peligroso estos materiales necesitan una gestión adecuada de los mismos. El Real Decreto 777/2012 recoge en su Anexo I (Tabla 1) una serie de residuos relativos a la minería que son considerados como inertes. De este modo, habría que considerar como residuos inertes, a aquellos residuos con contenidos en metales pesados y metaloides que no superen los valores mínimos, tanto los que se encuentran regulados como tales en la Lista Europea de Residuos (LER) con el código 01, relativo a la minería metálica, como los que no superen los niveles genéricos de referencia (NGR) de las CCAA que así lo tienen legislado, las que no se le aplica la fórmula EPA ($NR = NF + n DE$, donde NR =nivel de referencia, NF =nivel de fondo, DE =desviación estándar de la media de los valores de fondo propios de la zona) (Como inertes, cumplen una serie de características detalladas en las tablas del Anexo I, se aplica el art 3.7.e del RD 975/2009 y el subapartado 1.1.2 d) donde serán los metales (As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V y Zn) lo suficientemente bajos como para que el riesgo sea admisible.

Llegados a este punto, nos preguntamos, qué pasa con aquellos residuos con contenidos en metales pesados y metaloides que superan los niveles mínimos citados anteriormente. A este respecto, habría que concluir que estos residuos, en primer lugar, no deberían ser considerados como residuos inertes, sino que profundizando deberían ser peligrosos. Si se continúa con el análisis del anexo I el RD 777/2012, se llega a la metodología que esta normativa propone para la realización de las pruebas de los residuos de industrias extractivas para su clasificación como "peligrosos", que a su vez estará sujeta a la normativa sobre residuos peligrosos. Así para la caracterización de estos residuos peligrosos aplicamos la Decisión de la Comisión (2009/360/CE). Y en cuanto a la manipulación de los residuos se debe tener en cuenta la identificación y clasificación de los residuos según la Lista Europea de Residuos, publicada mediante la Orden MAM/304/2002. Dicha lista es una lista armonizadora de residuos que se

revisará periódicamente a la luz de nuevos acontecimientos, incluidas sus características peligrosas tal como se establece en dicha Orden Ministerial y en el anexo III de la ley 22/2011, que se ocupa de las características de los residuos que permiten calificarlos como peligrosos. En la LER se entienden como peligrosos aquellos que llevan un asterisco (*) tras el código, tal y como son los siguientes residuos que se incluyen en el grupo 01 03 denominado como “Residuos de la transformación física y química de minerales metálicos”. La Decisión 2000/532/CE [3] expone un listado de sustancias peligrosas al que hace referencia la Ley 22/2011 en su art 6. Resaltar que en el anexo apartado 4, todo residuo que lleve (*) está sujeto a la Directiva 91/689/CEE de residuos peligrosos y el apartado 5 cita como “metal pesado” siempre que este clasificado como sustancia peligrosa. Esta Decisión sufre una modificación por parte de la Decisión 2001/118/CEE, e introduce una serie de códigos relativos a la industria extractiva de la minería metálica. Con posterioridad, sufre dos modificaciones (Decisión del Consejo 2001/119 de 22 de enero y Decisión Consejo 2001/573, de 23 de julio), recogidas por la Orden Ministerial MAM 304/2002, ya citada. Así, al comparar esta nueva lista con la LER de la Decisión 2000/532/CE, se puede comprobar que hay códigos que han sido eliminados y dejados de ser considerados residuos como tal, como por ejemplo es el caso del código “01 03 01. Estériles”, que antes se consideraban inertes y ahora han pasado a ser considerados como residuos peligrosos en aquellos casos en los que contienen sustancias peligrosas (01 03 05*), o sulfuros (01 03 04*). La lista de residuos será vinculante para la determinación de los residuos que han de considerarse residuos peligrosos. La inclusión de una sustancia u objeto en la lista no significará que deba considerarse residuo en todas las circunstancias. Una sustancia u objeto se considerará residuo únicamente cuando corresponda a la definición del artículo 3, punto 1 de la ley 22/2011. Conforme a esto, los residuos de minería metálica recogidos en el LER con el código “010101. Residuos de extracción de minerales metálicos” no aparecen recogidos como inertes en el anexo I el RD 777/2012, por lo que se estaría en disposición de considerarlos como residuos no inertes. No obstante, y en el supuesto de que estos residuos fuesen no inertes, podrían ser residuos peligrosos. En consecuencia, surge aquí la pregunta de qué ocurre con los residuos afectados por el código “010101. Provenientes de la extracción de minerales metálicos” que no son inertes, pero

que tampoco aparecen con el (*) que los identificaría como residuos peligrosos, y que superan los niveles y valores anteriormente referenciados (valores límite y niveles genéricos de referencia) como para ser considerados como peligrosos. Además, para ser residuo peligroso según el Art. 6.2 de la Ley 22/2011, se podrá considerar un residuo como peligroso cuando, aunque no figure en la lista como tal, presente una o más de las características indicadas en el Anexo III. Entre estas características se destaca H6 (Tóxico) y H7 (Cancerígeno), en cuanto a los residuos relativos a las industrias extractivas. Pero sin embargo este carácter no aparece reflejado en la normativa aplicable (RD 777/2012 y Decisión 2000/532/CE). Consecuentemente, se hace necesario una implementación de la consideración de los aspectos toxicológicos asociados a estos materiales derivados de la minería metálica, en la legislación que los regula de tal modo que se asegure, por un lado su adecuada gestión, y por otro que se minimicen los riesgos de salud ambiental asociados a los mismos. Además de todo lo expuesto anteriormente, cabría ahora discutir el carácter de los residuos de minería metálica, además de cómo peligroso o no, como recurso, subproducto o estrictamente como residuo, ya que dependiendo de la consideración que se le aplique las consecuencias de índole práctico, económico y ambiental serán muy dispares. Ya que la consideración jurídica para los tres supuestos es totalmente distinta, en tanto y en cuanto que los residuos (el suelo contaminado es tratado como residuo [4]), están regulados por todo el marco normativo anteriormente descrito, mientras que para el caso de los subproductos de producción [5-7], y de los recursos la normativa de aplicación es totalmente diferente, entre otras cuestiones por la introducción del epíteto “peligroso” a la hora de describir a estos materiales. Por tanto, nos encontramos ante la paradoja de que unos mismos materiales minerales puedan o no tener la consideración de peligrosos (residuo peligroso [3]), por lo que sería conveniente el tener en consideración esta cuestión para los posibles cambios normativos que pudiesen abordarse sobre este campo en un futuro.

4. Conclusiones

Se puede concluir que la no existencia de regulaciones, tanto de los niveles de fondo como en los NGR en todas las Comunidades

Autónomas, dificulta el poder aplicar, de forma efectiva, una normativa específica al respecto.

Por otro lado, la consideración de los residuos de la minería, incluida la metálica, conforme a la Lista Europea de Residuos vigente con el carácter de no peligrosos, y por tanto sin (*), hace que los mismos permanezcan en un limbo jurídico en el marco normativo español.

En consecuencia, parece necesaria la revisión de una normativa que parece anticuada en lo relativo a la minería y poco desarrollada en cuanto a la gestión de las industrias extractivas en lo referente a materiales peligrosos.

Por último, resaltar que la Jurisprudencia es escasa en materia de consideración de suelo contaminado, y prácticamente nulo en lo relativo a la minería metálica. A este respecto, existe solo alguna jurisprudencia emitida por el Tribunal de Justicia de la Unión Europea a la hora de intentar clarificar el concepto de subproducto de industrias extractivas frente al concepto de residuo.

5. Agradecimientos

Agradecer al equipo del TAIDA el poder formar parte de este grupo de doctorado.

6. Referencias bibliográficas

[1] Martínez Sánchez M.J., Pérez Sirvent, C. 2007. Niveles de fondo y niveles genéricos de referencia de metales pesados en suelos de la Región de Murcia. Secretaria Autonómica para la Sostenibilidad. Dirección General de Calidad Ambiental. Murcia, España. 296pp.

[2] Gómez Ros J.M., García G., Peñas J.M. 2013. Assessment of restoration success of former metal mining areas after 30 years in a highly polluted Mediterranean mining area: Cartagena-La Union. Ecol. Eng. 57: 393-402.

[3] STJUE de 7 de marzo de 2013. Asunto C-358/11. Reglamento Reach (residuo peligroso).

[4] STJCE de 7 de septiembre de 2004 (C-1/03), *Van de Walle*: conceptos de “residuo”, “productor de residuos” y de “poseedor de residuos”.

[5] STJCE de 15 de junio de 2000 (C-418/97 y C-419/97); *ARCO*: concepto de residuo: acción de “desprenderse” y Anexo II.B DM. Doctrina de los indicios para que las autoridades nacionales distinguan entre residuo y residuo de producción.

[6] STJCE de 18 de abril de 2002, (C-9/00); *PalinGranitOy*: concepto de residuo. El propio Tribunal comienza a aplicar la “doctrina de los indicios”: la ganga minera es residuo.

[7] STJCE de 11 de septiembre de 2003 (C-1146/01), *Avesta PolaritChromeOy*: concepto de residuo y ámbito de aplicación (art. 2.1.b DM). La ganga minera puede no ser considerada residuo en determinadas circunstancias.

Tablas

Tabla 1. Anexo I. RD 777/2012. Lista residuos inertes.

Código	Denominación
01	Residuos de prospección, extracción de minas y canteras y tratamientos físicos y químicos de minerales
01 01	Residuos de la extracción de minerales
01 01 02	Residuos de la extracción de minerales no metálicos
01 04	Residuos de la transformación física y química de minerales no metálicos
01 04 08	Residuos de grava y rocas trituradas distintos de los mencionados en el código 01 04 07.
01 04 09	Residuos de arena y arcillas
01 04 10	Residuos de polvo y arenilla distintos de los mencionados en el código 01 04 07
01 04 12	Estériles y otros residuos del lavado y limpieza de minerales, distintos de los mencionados en los códigos 01 04 07 y 01 04 11
01 04 13	Residuos del corte y serrado de piedra distintos de los mencionados en el código 01 04 07.
01 05	Lodos y otros residuos de perforaciones
01 05 04	Lodos y residuos de perforaciones que contienen agua dulce

Effect of genetic background on resistance to Meloidogyne incognita in pepper

F. Sánchez-Solana, C. Ros, C.M. Lacasa, M.C. Martínez, A. Lacasa

Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos. IMIDA, C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia). E-mail: fulgencio.sanchez8@carm.es

Resumen

En pimiento (*Capsicum annuum* L.) los genes mayores *Me1*, *Me3* y *N* confieren resistencia cualitativa frente a *M. incognita* (principal nematodo patógeno de solanáceas). Sin embargo se han encontrado poblaciones del nematodo virulentas a algunos de estos genes que comprometen la eficacia de estas resistencias. No obstante se ha constatado una mayor durabilidad de estos genes mayores cuando se introgresan en fondos genéticos parcialmente resistentes. El objetivo fue explorar la influencia del fondo genético del pimiento controlando la resistencia parcial cuando se combina con los genes *Me1* y *Me3*, su estabilidad y su modo de herencia. Se utilizaron líneas puras de pimiento susceptibles, parcialmente resistentes y portadoras de *Me1* o *Me3*, y se construyeron diversos híbridos F1. Este material vegetal se testó frente a 3 aislados de *M. incognita* (dos de éstos virulentos a *Me3*), y se comparó su nivel de resistencia. Los resultados mostraron diferencias de tipo cuantitativo en la resistencia a *M. incognita* debidas al efecto del fondo genético, que se expresaron tanto en ausencia como en presencia de genes mayores de resistencia. Esta resistencia cuantitativa se mostró estable frente a los distintos aislados del patógeno y presentó un modo de herencia intermedio.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, resistencia genética, nematodos, virulencia

Abstract

In pepper, three major genes –*Me1*, *Me3* and *N*–confer qualitative resistance against *Meloidogyne incognita* (main pathogen nematode of Solanaceae). However, nematode virulent populations to some of these genes have been found, threatening the effectiveness of these resistances. Nevertheless higher durability of these major genes has been found when these are introgressed in partially resistant genetic background. The aim was to explore the influence of pepper genetic background controlling partial resistance when combined with *Me1* and *Me3* genes, its stability and its mode of inheritance. Some pepper inbred lines susceptible, partially resistant or resistant (that carriers *Me1* or *Me3*) were used, and several hybrids F1 were built. This plant material was tested against 3 *M. incognita* isolates (two virulent to *Me3*), and their level of resistance was compared. The results showed quantitative differences in resistance to *M. incognita* due to the effect of genetic background, which was expressed both in presence and absence of qualitative resistance genes. This quantitative resistance was stable against different isolates of the pathogen and presented an intermediate inheritance mode.

Keywords: *Capsicum annuum*, genetic resistance, nematodes, virulence

1. Introducción

Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood (Tylenchida) está considerado el principal nematodo fitopatógeno a escala mundial que afecta, entre otros cultivos, al pimiento (*Capsicum annuum* L.) provocándole daños en las raíces y ocasionando descensos importantes en sus cosechas [1]. En los últimos años, las restricciones en el uso de nematicidas y desinfectantes químicos han motivado el uso de resistencias genéticas como alternativa para el control del patógeno [2]. Consecuentemente, en la actualidad se están desarrollando programas de mejora genética con el fin de introgresar los genes de resistencia en porta-injertos y variedades élite.

En pimiento se han identificado tres genes mayores que confieren resistencia cualitativa frente a *M. incognita*, denominados *Me1*, *Me3* y *N*, y localizados en la misma región cromosómica [3]. Sin embargo, tanto en condiciones controladas como en cultivo en campo, se han encontrado casos de poblaciones virulentas a algunos de estos genes que comprometen la eficacia de estas resistencias [4, 5]. Estudios recientes han demostrado que la introgresión de genes mayores de resistencia en fondos genéticos parcialmente resistentes pueden reducir los casos de virulencia, favoreciendo la durabilidad de la resistencia [6].

El objetivo de este estudio fue explorar la influencia del fondo genético del pimiento controlando la resistencia parcial cuando se

combina con genes mayores de resistencia a *Meloidogyne incognita*, su estabilidad frente a diferentes aislados del nematodo y su modo de herencia.

2. Materiales y Métodos

Partiendo de las líneas puras resistentes HDA330 (portadora de *Me1*), HDA149 y SCM (ambas portadoras de *Me3*), y de las líneas AMC, BRB, YW (susceptibles) y CTL y DLR, (parcialmente resistentes) se obtuvieron 15 líneas F1, resultado del cruzamiento de cada línea resistente (portadora de gen *Me*) por cada línea susceptible o resistente parcial. Cada una de las líneas (parentales e híbridos) se testó frente a dos poblaciones virulentas a *Me3* y una avirulenta de *M. incognita*. Cada planta, que se cultivó individualmente en maceta, se inoculó con una dosis de 400 juveniles de segundo estadio de desarrollo del nematodo y se mantuvo durante 8 semanas en condiciones ambientales controladas (temperatura 24 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 h. de luz). Al cabo de este tiempo (duración de un ciclo del nematodo) se examinaron las raíces y se contó el número total de masas de huevos por planta (MH) que se utilizó como parámetro de resistencia. Los datos obtenidos de MH fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) a dos vías para los factores 'genotipo de pimiento', 'aislado de nematodo' y la interacción 'genotipo X aislado'. Se utilizó el test de Tuckey para discriminar entre medias, cuando éstas fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$). Para conocer el modo de herencia (intermedia o dominante) de la resistencia cuantitativa los valores de las MH de los híbridos F1 se compararon con el valor medio de sus respectivas líneas parentales utilizando la prueba T de Student. Además, los efectos genéticos de este carácter se clasificaron mediante el valor del ratio 'd/a' como aditivos ($'d/a' < 0.2$), parcialmente dominante ($0.2 < 'd/a' < 0.8$), dominante ($0.8 < 'd/a' < 1.2$) o sobredominante ($'d/a' > 1.2$) de acuerdo a Stuber et al. [7], donde 'a' equivale al valor medio de la diferencia entre las líneas parentales, y 'd' equivale a diferencia entre el valor del híbrido y la de la media de sus parentales.

3. Resultados y Discusión

3.1. Líneas parentales

En las líneas parentales, el ANOVA para los datos de MH resultó significativo para los factores

'genotipo', 'aislado' y la interacción 'genotipo X aislado'. Entre las líneas no portadoras de genes *Me*, CTL fue la que menos se infestó con cualquiera de los tres aislados de *M. incognita*. DLR también se infestó menos que AMC, BRB y YW, pero las diferencias respecto a éstos sólo fueron significativas con uno de los tres aislados utilizados. Las líneas portadoras de genes mayores de resistencia, HDA330 (portadora de *Me1*) no se infestó con ninguno de los aislados, y HDA149 y SCM (portadores de *Me3*) sólo se infestaron con los dos aislados virulentos, aunque SCM presentó menos MH que HDA149, el cual se infestó al mismo nivel que las líneas susceptibles. Estos resultados ponen de manifiesto la presencia de resistencia parcial en las líneas CTL, DLR y SCM conferida por su fondo genético, y que coincide con lo obtenido anteriormente en condiciones de campo [8].

3.2. Líneas híbridas

El ANOVA de los cinco híbridos procedentes de HDA330 (portadores de *Me1*) mostró efecto de los factores 'genotipo' y 'aislado', pero no para la interacción entre ambos factores. El híbrido con fondo genético de CTL fue el más resistente y el de fondo genético de AMC el que más se infestó, aunque en todos los casos los valores de MH fueron muy bajos debido al efecto de *Me1*. Los híbridos portadores de *Me3* no se infestaron con el aislado avirulento, por lo que en el ANOVA sólo se tuvieron en cuenta los datos procedentes de los dos aislados virulentos a *Me3* de *M. incognita*. Tanto en los híbridos procedentes de HDA149 como en los procedentes de SCM se encontró efecto para el factor 'genotipo', pero no para la interacción 'genotipo X aislado'. Sólo en los híbridos procedentes de SCM fue significativo el factor 'aislado'. Los híbridos con fondo genético de CTL fueron los que menos se infestaron mientras que los procedentes de AMC y YW los que más. Los híbridos con fondo genético de DLR siempre mostraron mayor nivel de resistencia que los de AMC.

Por lo tanto la resistencia parcial conferida por el fondo genético también se expresó cuando se combinó con genes de resistencia cualitativa, disminuyendo cuantitativamente la reproducción del nematodo, lo cual coincide con los resultados obtenidos en un trabajo anterior [6]. Además se comprobó que su efecto es estable frente a diferentes aislados de *M. incognita*, ya que no se encontró interacción 'genotipo X aislado', lo que la define como resistencia de tipo horizontal, una característica

frecuentemente asociada a las resistencias de tipo cuantitativo [9].

3.3. Modo de herencia

Para su análisis sólo se incluyeron los genotipos híbridos procedentes de parentales con diferente grado de resistencia debido sólo al efecto de su fondo genético. Por consiguiente se excluyeron tanto los híbridos portadores de *Me1* como los portadores de *Me3* testados frente al aislado avirulento, ya que en estos casos el efecto dominante del gen mayor de resistencia predominó sobre el efecto de la resistencia cuantitativa. La comparación entre el valor de MH de cada híbrido F1 respecto al valor promedio de sus respectivos parentales, testados frente al mismo aislado, no resultó significativamente diferente en ningún caso (tabla 1). Esto se corresponde con un patrón de herencia intermedia de la resistencia cuantitativa y que es acorde con el predominante efecto aditivo estimado mediante el cálculo del ratio 'd/a' que presentó valores desde 0,09 (completamente aditiva) a 0,54 (parcialmente dominante) (tabla 1). Probablemente este tipo de resistencia esté controlado por un sistema poligénico (QTLs), como ocurre en la mayoría de caracteres cuantitativos [10], aunque tal hipótesis debe de ser comprobada con un apropiado análisis genético (actualmente en desarrollo).

4. Conclusiones

Se ha puesto de manifiesto que la resistencia parcial a *Meloidogyne incognita* identificada en algunas líneas de pimiento es de efectos cuantitativos y presenta un modo de herencia intermedio, con efectos genéticos aditivos. Además se muestra estable frente a diferentes aislados del nematodo. Se considera de gran interés profundizar en estudios de análisis genético y prestaciones agronómicas en campo de este tipo de resistencia, por el interés que supone para su uso en la mejora genética de resistencias durables.

5. Agradecimientos

El equipo de Horticultura (IMIDA) y el Dr. A. Palloix (INRA) proporcionaron el material vegetal. Estudio financiado a través del Proyecto INIA RTA2009-0058 participado con Fondos FEDER. F. Sánchez ha disfrutado de una beca FPI-INIA.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Djian-Caporalino C., Fazari A., Arguel M. J., Vernie T., VandeCastele C., Faure I., Brunoud G., Pijarowski L., Palloix A., Lefebvre V., Abad P. 2007. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 114: 473–486.
- [2] Djian-Caporalino C., Palloix A., Fazari A., Marteu N., Barbary A., Abad P., Sage-Palloix A.M., Mateille T., Risso S., Lanza R., Taussig C., Castagnone-Sereno P. 2014. Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biol.* 14: 53.
- [3] Fazari A., Palloix A., Wang L.H., Hua M.Y., Sage-Palloix A.M., Zhang B.X., Djian-Caporalino C. 2012. The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the *Me*-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breed.* 131: 665–673.
- [4] Castagnone-Sereno P., Bongiovanni M., Palloix A., Dalmaso A. 1996. Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistance determinants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 585–590.
- [5] Ros-Ibáñez C., Robertson L., Martínez-Lluch M.C., Cano-García A., Lacasa-Plasencia A. 2014. Development of virulence to *Meloidogyne incognita* on resistant pepper rootstocks. *Span. J. Agric. Res.* 12: 225–232.
- [6] Barbary A., Palloix A., Fazari A., Marteu N., Castagnone-Sereno P., Djian-Caporalino, C. 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. *Theor. Appl. Genet.* 127: 499–507
- [7] Stuber C.W., Edwards M., Wendel J.F. 1987. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci.* 27: 639–648.
- [8] Sánchez-Solana F., Ros C., Guerrero M.M., Lacasa C.M., Sánchez-López E., Lacasa A. 2015. New pepper accessions proved to be suitable as a genetic resource for use in breeding nematode-resistant rootstocks. *Plant Genet. Resources: Characterization and Utilization.* DOI:10.1017/S1479262115000027.
- [9] Van der Plank J.E. 1968. Disease resistance in plants. Ed: Academic Press, Nueva York.

[10] St. Clair, D. A. 2010. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 247–268.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Comparación del número de masas de huevos por planta (MH) obtenidos en los híbridos portadores del gen *Me3* con respecto al valor promedio de sus respectivos parentales testados con dos aislados virulentos de *M. incognita* (Vir-1 y Vir-2), y estimación de los efectos genéticos (aditivos o dominantes) de la resistencia cuantitativa.

Genotipo	Aislado	Valor de MH Híbridos F1	Valor promedio de MH de los parentales	Valor-P T-test ¹	Efectos genéticos ²
CTL x HDA149	Vir-1	80.8±10.7	101,9±6.2	0,096	PD
	Vir-2	97.2±14.5	91,5±8.2	0,989	A
DLR x HDA149	Vir-1	138.1±10.0	129,1±8.3	0,532	A
AMC x SCM	Vir-1	97.8±7.5	116,4±10.1	0,209	PD
	Vir-2	111.1±11.6	128,4±10.3	0,236	PD
BRB x SCM	Vir-1	98.3±8.8	115,2±11.5	0,339	PD
	Vir-2	120.8±11.3	107,9±6.5	0,513	PD
CTL x SCM	Vir-1	51.2±6.0	39,9±2.7	0,135	PD
	Vir-2	69.7±7.3	55,5±4.9	0,184	PD
YW x SCM	Vir-1	97.3±5.6	111,3±11.2	0,462	PD
	Vir-2	129.2±11.9	116,3±4.5	0,519	PD

¹Valor-P<0.05 del T-test indica diferencias significativas.

² Efectos genéticos estimados mediante el cálculo del ratio 'd/a' según Stuber *et al.* [7]. A: efecto aditivo (d/a=0-0.2); PD: efecto parcialmente dominante (d/a= 0.21-0.8).

Feasibility of using of the maximum daily trunk shrinkage and stem water potential reference lines for irrigation scheduling of early nectarine tree

J.M. de la Rosa, M.R. Conesa, R. Domingo, A. Pérez-Pastor

Dpto. Producción Vegetal, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 52, CP: 30203, Cartagena, España. Josemdlrs@hotmail.com

Resumen

Se realizó un estudio durante tres años en nectarinos extra tempranos (*Prunus persica* L. Batsch cv. Flanoba) con el objetivo de estudiar la dependencia de la máxima contracción de diámetro de tronco (MCD) y el potencial hídrico de tallo (Ψ_T) con variables climáticas y evaluar la utilidad de las líneas de referencia (relaciones entre variables meteorológicas y los indicadores de estado hídrico de la planta) para su utilización en la programación del riego. Los árboles se regaron mediante riego localizado y bajo condiciones no limitantes de agua en el suelo. Las medidas de Ψ_T y MCD se relacionaron con variables meteorológicas. MCD presentó el mejor ajuste con temperatura y déficit de presión de vapor promedio del periodo comprendido entre las 11:00–15:00 hora solar, ya que una importante fracción de la contracción del tronco ocurría en dicho periodo, alcanzando el 74% de la MCD (promedio de los tres años de estudio), y a veces el 90%. A pesar del continuo crecimiento del tronco durante el periodo experimental y las ligeras diferencias de carga productiva, no se observaron diferencias interanuales entre las líneas de referencia estudiadas. Ψ_T mostró peores correlaciones con las variables meteorológicas.

Palabras clave: fluctuaciones de diámetro de tronco; líneas base; indicadores del estado hídrico de la planta

Abstract

A three-year experiment on early nectarine (*Prunus persica* L. Batsch cv. Flanoba) trees was carried out with the aim of studying the impact of environmental variables on the maximum daily trunk shrinkage (MDS) and stem water potential at midday (Ψ_{stem}) and the usefulness of the reference-lines derived from the relationship between different meteorological variables and plant water status indicators for sustainable irrigation scheduling. Plants were drip-irrigated and submitted to non-limiting soil water conditions. Measurements of Ψ_{stem} and MDS were related with meteorological variables. MDS presented the best fitting line-regressions with both the average air temperature and vapour pressure deficit during the period 11.00–15.00 h solar time, since an important fraction of trunk shrinkage occurred during that of time day, reaching 74% of MDS (on average over the three years), and sometimes 90%. Despite the continuous trunk growth of the trees during the experimental period and slight difference in crop load, inter-annual differences were not observed for the three reference lines obtained. Ψ_{stem} present worst correlations with meteorological variables.

Keywords: trunk diameter fluctuation; Base-lines; plant water status indicators

1. Introducción

En zonas áridas como la región de Murcia el agua de riego es el principal factor limitante para los cultivos de regadío. Altas necesidades hídricas junto con baja dotación de agua para los agricultores es un problema que sólo puede afrontarse mediante la optimización de los recursos hídricos.

Para poder llevar a cabo un uso eficiente del agua de riego es necesario realizar una buena programación del riego, es decir, determinar de forma precisa cuanto y cuando hay que regar. Si la programación del riego no es correcta el cultivo puede sufrir un estrés debido al déficit o

al exceso de agua, lo cual puede mermar la cantidad y calidad de la cosecha. Además, un exceso de riego lleva asociado mayores costes derivados del precio del agua y de la energía necesaria para su impulsión y genera pérdidas de nutrientes por lixiviación, lo que crea un coste ambiental en forma de contaminación de acuíferos subterráneos, junto con un empobrecimiento del suelo.

Todo lo anterior confirma la importancia de realizar una programación de riego precisa y segura. A pesar de los avances que se han realizado en los últimos años todavía no se han conseguido predictores precisos de los requerimientos hídricos del cultivo [1].

En la actualidad se utilizan principalmente dos enfoques para programar el riego, el balance hídrico, basado en la evapotranspiración de referencia y los coeficientes de cultivo [2] o el contenido y estado energético del agua en el suelo. Ambas metodologías han mejorado la eficiencia del uso del agua respecto a los métodos tradicionales, basados solamente en la experiencia del agricultor. Sin embargo, la incertidumbre que llevan asociados los coeficientes de cultivo y la variabilidad de las medidas de agua en el suelo invitan a estudiar nuevos métodos que no tienen estos inconvenientes.

En este sentido, la programación del riego en base al estado hídrico de la planta se postula como una herramienta prometedora para incrementar la eficiencia de uso del agua de riego ya que las medidas en planta integran factores climáticos, del estado hídrico del suelo y de la propia planta [3]. Esta metodología adquiere mayor importancia en condiciones de riego deficitario ya que posibilitan la utilización de valores umbrales de estrés hídrico en planta, lo que minimiza el riesgo que supone regar al cultivo por debajo de sus necesidades.

Los indicadores del estado hídrico de la planta no sólo se ven afectados por el contenido de agua útil en el suelo sino que también depende de la demanda atmosférica, entre otras variables. Por tanto, los valores absolutos de indicadores sin considerar la demanda evaporativa podrían resultar inútiles [4]. Por esta razón se suele utilizar el concepto de intensidad de señal (IS) para la programación del riego, normalizando los valores absolutos del indicador al relacionarlos con los valores obtenidos bajo condiciones no limitantes de agua en el suelo [5]. Los valores bajo condiciones no limitantes de agua en el suelo pueden obtenerse mediante la medida en árboles correctamente regados o a partir de ecuaciones de referencia que permitan predecir estos valores en base a alguna variable climática. El objetivo de este trabajo fue obtener las ecuaciones de referencia para el nectarino extratemprano y evaluar su utilidad en la programación del riego.

2. Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo entre 2009 y 2012 en una finca comercial situada en Murcia (38° 8' N; 1° 13' W). Se seleccionó una parcela experimental de 1 ha con nectarinos extratempranos (*Prunus persica* cv. 'Flanoba') injertados sobre patrón híbrido GF677 y distribuidos en un marco de plantación de 6 x 3.5

m. El sistema de riego localizado constaba de dos líneas portaemisores con goteros autocompensantes de 1.6 l·h⁻¹ colocados de forma continua cada 75 cm. El riego se programó semanalmente y se aplicó diariamente por la noche a lo largo de todo el periodo de estudio.

Se estableció un tratamiento control (T_{CTL}), regado para satisfacer las necesidades hídricas totales del cultivo determinadas a partir de la evapotranspiración de referencia (ET₀); coeficientes de cultivo (K_c) propuestos por el Sistema de Información Agraria de Murcia (www.siam.es) y coeficiente de uniformidad de los emisores (C_u). Los requerimientos de lavado (RL) fueron determinados en base a la conductividad eléctrica del agua de riego.

El diseño experimental consistió en tres repeticiones por tratamiento, distribuidas en bloques al azar. Cada repetición tenía tres filas de 15 árboles por fila. Las medidas se realizaron en la fila central, siendo las otras dos utilizadas como bordes.

Se midió semanalmente el contenido volumétrico de agua en el suelo en el perfil 0-100 cm con una sonda portátil FDR (Diviner 2000, Sentek Pty. Ltd., South Australia) en 3 tubos de acceso por tratamiento situados en el bulbo húmedo. Las medidas se realizaron entre las 10 y 12 h (hora solar).

La fluctuación de diámetro del tronco fue monitoreada en cada tratamiento con 6 sensores de desplazamiento lineal (LVDT; Solartron Metrology, Bognor Regis, UK, model DF ± 2.5 mm, precisión ± 10 µm) colocados en el tronco a 30 cm sobre el suelo y orientados al norte. Se utilizaron portasensores de invar (una aleación compuesta por 64% de Fe y 35% Ni que presenta coeficientes de dilatación térmica mínimos). Se determinó MCD como la diferencia entre el máximo (MXDT) y el mínimo diámetro de tronco (MNDT), que tuvieron lugar al alba y por la tarde, respectivamente.

Semanalmente, se midió el potencial de tallo (Ψ_T) a mediodía solar, en hojas sanas, adultas, cercanas al tronco y envueltas con film de plástico y papel de aluminio al menos dos horas antes de su medida. Para las medidas se utilizó una cámara de presión (Soil Moisture Equipment Corp. Model 3000) de acuerdo con el procedimiento descrito por [6].

3. Resultados y Discusión

El contenido volumétrico de agua en el suelo mostró continuamente valores en torno al 30 %,

próximos a capacidad de campo, lo que indica que el suelo estuvo bien hidratado durante todo el periodo de estudio.

La producción total en 2010 (53.9 kg· árbol⁻¹) fue significativamente superior a la de los años 2009 (41.1 kg· árbol⁻¹) y 2012 (43.5 kg·árbol⁻¹).

Ψ_T alcanzó valores mínimos (en torno a -1 MPa) entre julio y agosto y máximos (en torno a -0,5 MPa) en primavera y otoño. Estos valores son característicos de plantas bien regadas.

MDS presentó correlaciones significativas con todas las variables meteorológicas estudiadas. El déficit de presión de vapor al mediodía (DPV_{md}) fue la variable que mejor explicó a MCD con coeficientes de determinación en torno a 0.75 (Tabla 1). El hecho de que las medidas al mediodía del DPV sean las que mejor explica a MCD puede deberse a que una importante fracción de la contracción del tronco ocurría en dicho periodo, alcanzando el 74% de la MCD (promedio de los tres años de estudio), y a veces hasta 90 %. En cambio, las correlaciones de MCD con ET₀ presentaron los peores ajustes.

Al comparar las líneas de regresión de diferentes años no se encontraron diferencias significativas ni en la pendiente ni en la ordenada de las rectas cuando se considera el periodo entero de crecimiento. Sin embargo, las líneas de referencia presentaron diferencias según el periodo fenológico considerado, las líneas de referencia durante el crecimiento del fruto tenían menor pendiente que las de la poscosecha. Las líneas de referencia de la poscosecha temprana y tardía eran paralelas entre sí pero tenían ordenadas en el origen diferentes, siendo menor el de la poscosecha tardía (Figura 1). En melocotonero temprano no se encontraron diferencias significativas entre regresiones lineales de diferentes periodos fenológicos.

Las regresiones lineales con Ψ_T presentaron menor grado de ajuste. Los mayores coeficientes de determinación (en torno a 0.50) se obtuvieron con la temperatura media diaria (Tabla 1).

4. Conclusiones

Las líneas de referencia de la MDS han sido estables durante tres años a pesar de que el cultivo estuvo bajo diferentes cargas productivas

y en continuo crecimiento del tronco. Además, se han obtenido altos coeficientes de determinación cuando MCD se relacionaba con DPV_{md}.

Por lo tanto, las ecuaciones obtenidas podrían ser utilizadas con fines de programación del riego.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio Español de Ciencia e innovación (AGL2010-19201-C04-04) y por el proyecto europeo SIRRIMED (FP7-KBBE-2009-3-245159).

6. Referencias bibliográficas

- [1] Naor, A., Cohen, S., 2003. The sensitivity and variability of maximum trunk shrinkage, midday stem water potential, and transpiration rate in response to withholding of irrigation in field-grown trees. *Hortsc* 38, 547–551.
- [2] Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. Irrig. Drain. Paper No. 56. FAO, Rome, Italy, p. 300.
- [3] Jones, H.G., 1989. Water stress and stem conductivity. In: Cherry, J.H. (Ed.), *Environmental Stress in Plants*, vol. 19. Springer-Verlag, Berlín, pp. 17–24.
- [4] Galindo, A., Rodríguez, P., Mellisho, C.D., Torrecillas, E., Moriana, A., Cruz, Z.N., Cone-jero, W., Moreno, F., Torrecillas, A., 2013. Assessment of discretely measured indicators and maximum daily trunk shrinkage for detecting water stress in pomegranate trees. *Agric. For. Meteorol.* 180, 58–65.
- [5] Goldhamer, D.A., Fereres, E., 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. *Irrig. Sci.* 20, 115–125.
- [6] Hsiao, T.C., 1990. Measurements of plant water status. In: Steward, B.A., Nielsen, D.R. (Eds.), *Irrigation of Agricultural Crops*. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 243–279.

Tabla 1.- Parámetros de las líneas de regresión ($Y=a+bx$), coeficiente de determinación (r^2), número de puntos (n) y suma de cuadrados (MSE).

	a	b	r ²	n	MSE	a	b	r ²	n	MSE
MCD vs ETo						Ψ_T vs ETo				
todo	-22.18	41.77	0.373 ***	631	6569	-0.3295	-0.0685	0.168 ***	64	0.0428
09-10	-68.75	53.54 c	0.626 ***	195	4329	-0.1850	-0.1056	0.288 *	20	0.0378
10-11	33.97	29.05 a	0.197 ***	207	7801	-0.5693	-0.0202	0.014 ns	20	0.0629
11-12	-31.85	42.62 b	0.344 ***	229	6796	-0.1991	-0.0852	0.379 **	24	0.0272
MCD vs VPDm						Ψ_T vs VPDm				
todo	-24.21	163.08	0.617 ***	631	4004	-0.2021	-0.3601	0.431 ***	64	0.0293
09-10	-19.73	165.35	0.729 ***	195	3135	-0.1653	-0.4241	0.526 ***	20	0.0252
10-11	-11.02	150.58	0.503 ***	207	4806	-0.2211	-0.3514	0.340 **	20	0.0421
11-12	-40.95	172.75	0.617 ***	229	3965	-0.1998	-0.3259	0.503 ***	24	0.0218
MCD vs VPDmx						Ψ_T vs VPDmx				
todo	-43.99	79.12	0.740 ***	631	2722	-0.2021	-0.1545	0.388 ***	64	0.0315
09-10	-36.76	78.31	0.817 ***	195	2119	-0.1836	-0.1738	0.449 ***	20	0.0293
10-11	-39.52	78.11	0.646 ***	207	3424	-0.2278	-0.1512	0.271 *	20	0.0465
11-12	-56.29	81.41	0.751 ***	229	2577	-0.1818	-0.1450	0.507 ***	24	0.0216
MCD vs VPDmd						Ψ_T vs VPDmd				
todo	-35.93	87.49	0.747 ***	631	2650	-0.1985	-0.178	0.390 ***	64	0.0314
09-10	-29.27	86.70	0.835 ***	195	1902	-0.1285	-0.2164	0.521 ***	20	0.0254
10-11	-29.53	85.39	0.641 ***	207	3470	-0.2676	-0.1571	0.236 *	20	0.0487
11-12	-49.04	90.29	0.744 ***	229	2644	-0.1910	-0.1650	0.454 ***	24	0.0230
MCD vs Tm						Ψ_T vs Tm				
todo	-192.57	16.85	0.599 ***	631	4195	0.2914	-0.0417	0.517 ***	64	0.0249
09-10	-230.66	18.73 b	0.763 ***	195	2745	0.3805	-0.0463	0.484 ***	20	0.0274
10-11	-168.35	15.57 a	0.475 ***	207	5082	0.3367	-0.0440	0.464 ***	20	0.0342
11-12	-173.99	16.02 a	0.559 ***	229	4569	0.1977	-0.0365	0.598 ***	24	0.0176
MCD vs Tmx						Ψ_T vs Tmx				
todo	-285.52	15.91	0.706 ***	631	3073	0.4285	-0.0359	0.470 ***	64	0.0249
09-10	-299.22	16.51	0.824 ***	195	2030	0.5770	-0.0412	0.494 ***	20	0.0268
10-11	-274.07	15.47	0.613 ***	207	3741	0.5875	-0.0414	0.380 **	20	0.0395
11-12	-279.45	15.63	0.674 ***	229	3377	0.2735	-0.0299	0.559 ***	24	0.0193
MCD vs Tmd						Ψ_T vs Tmd				
todo	-253.53	15.87	0.701 ***	631	3123	0.3665	-0.0362	0.466 ***	64	0.0275
09-10	-265.56	16.50	0.831 ***	195	1955	0.5232	-0.0422	0.473 ***	20	0.0279
10-11	-235.59	15.15	0.596 ***	207	3913	0.3662	-0.0365	0.329 **	20	0.0428
11-12	-248.15	15.58	0.663 ***	229	3462	0.2384	-0.0308	0.574 ***	24	0.0187

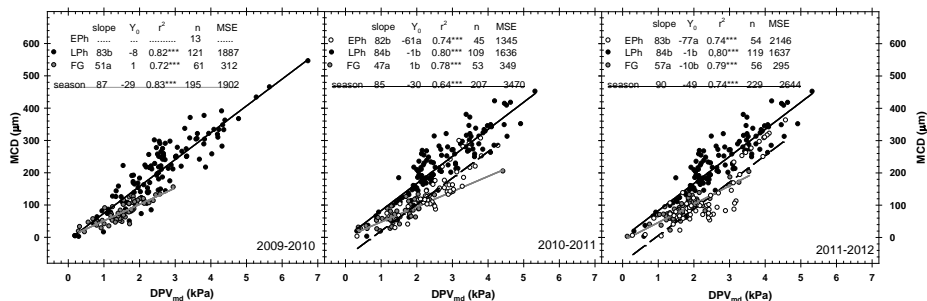


Figura 1.- Regresiones lineales de DPV_{md} vs MCD diferenciando entre los periodos fenológicos de crecimiento del fruto (FG, gris), poscosecha temprana (Eph, blanco) y poscosecha tardía (LPh, negro) en los ciclos 2009-2010 (izquierda), 2010-2011 (centro) y 2011-2012 (derecha).



ORAL SESSION IV

Agroforestry
Engineering

Calculation of biophysical indicators through the automatic processing of satellite images

M. Erena Arrabal⁽¹⁾, D. Sánchez⁽¹⁾, J. Pecci⁽²⁾, G. Lendrino⁽²⁾,
Z. Hernández⁽¹⁾, S. García⁽³⁾

⁽¹⁾ IMIDA, C/ Mayor s/n, 30.150. La Alberca. Murcia.manuel.arena@carm.es

⁽²⁾ INDRA Sistemas S.A., c/ Mar Egeo, nº 4. P. Industrial, N.º 1. 28830. San Fernando de Henares. Madrid.

⁽³⁾ UPCT, Grupo de I+D Gestión de Recursos Hídricos. Paseo Alfonso XIII, 52. 30203. Cartagena.

Abstract

In recent years, remote sensing has emerged as one of the most useful tools in agronomy. A series of biophysical indicators can be derived from satellite images and used as inputs for decision support systems in irrigation management, crop planning or determination of crop yields, thus achieving a better management of resources. An automated system implemented under the IDEaRM services provides these indicators on a daily rate to support in decision-making.

Keywords: remote sensing, NDVI, SDI.

1. Introduction

The term Spatial Data Infrastructure was first coined in 1993 by the US National Research Council to refer to a framework of technologies, policies and institutional arrangements that, working together, facilitate the creation, sharing and use of geospatial data and resource related information via a distributed information system. Later, in 1994, the US government creates the NSDI (National Spatial Data Infrastructure) and that same year he founded the Open GIS Consortium, later renamed Open Geospatial Consortium (OGC). 13 years after the EU adopted Directive 2007/2 / EC Infrastructure for Spatial Information in Europe-INSPIRE [1].

The Spatial Data Infrastructures -IDEaRM whose main objective is to integrate agriculture data, metadata and geographic information in the regional level. Providing all users with the location services, identification, selection and access to such resources through a geportal (<http://idearm.imida.es>), which also integrate interoperable resources producers of geographic information globally, EU, national, regional and local (Fig. 1) [2].

Remote sensing science and technology, and its applications in various fields, have experienced a successful development in recent decades. The Earth observation from space has become an irreplaceable tool for monitoring various environmental processes of great importance. Desertification processes, deforestation and forest loss or damage assessment after flooding are some aspects that can be studied by remote sensing.

One of the most important features of remote sensing is its ability to extract thematic information from certain measurements of the sensor. That is, other factors that help us better understand our environment can be derived from sensor data. For example, the chlorophyll content is a variable not directly measured by the sensor, but affects the spectral reflectance of the vegetation. So, it can be estimated indirectly by observing on which spectral bands its effect is more evident and isolating this component from other factors that may also influence such bands [3].

The IDEaRM objective is to improve the recommendations and monitoring of irrigation practices in major crops of the area of the Murcia Region. To achieve it, we have designed an automatic processing system to generate remote sensing products combining data from NOAA, MODIS and LANDSAT 8 satellite with data from a network of agro-meteorological stations. This system sets in motion a chain of data-driven processes (i.e., triggered by the availability of data).

One of the goals of this work is to develop an automatic system for processing remote sensing images from the U.S. Geological Survey-USGS, available at the regional level that is updated using interoperability standards proposed by the OGC, and as a basis for implementing the INSPIRE directive in this subject area.

2. Materials and methods

2.1 Landsat-8 data

Landsat 8 satellite images the entire Earth every 16 days and carries two instruments: The Operational Land Imager (OLI) sensor and the Thermal Infrared Sensor (TIRS) sensor. Landsat 8 data products are consistent with the all standard Level-1 specifications: OLI multispectral bands 1-7,9: 30-meters; OLI panchromatic band 8: 15-meters; TIRS bands 10-11: 100 meters; Orthorectified; 16-bit pixel value Table 1 [4].

2.2 Automatic processing system

The LANDSAT-8 images are downloaded by http and stored into directory. The products are automatically detected and they are ingested in the products archive.

The sensor network is registering the air temperature observations each hour. This data are collected and stored by the automatic system (Fig. 2).

Each LANDSAT-8 image received is processed to generate the following products covering the area of Murcia: Radiance, Reflectance, NDVI, LSTB10, LSTB11, SAVI, LAI and AT. The descriptions of the products are available on the catalogue of website. <http://idearm.imida.es/>

2.3 SOS Server

The system makes use of OGC standard web services: SOS (Sensor Observation Service) is used to store and make available the in-situ data observations. Its role is to collect the observations from the sensor network. This implementation is foreseen to be based on SOS 52^o North open source implementation [5].

2.4 Reflectance

The standard Landsat 8 products provided by the USGS EROS Center consist of quantized and calibrated scaled Digital Numbers (DN) representing multispectral image data acquired by both the Operational Land Imager (OLI) and Thermal Infrared Sensor (TIRS). The products are delivered in 16-bit unsigned integer format and can be rescaled to the Top Of Atmosphere (TOA) reflectance and/or radiance using radiometric rescaling coefficients provided in the product metadata file. The MTL file contains the thermal constants needed to convert TIRS data to the at-satellite brightness temperature. Further details can be found in the LDCM Cal/Val algorithm description document and the Landsat 8 Science

Users' Handbook available from the Landsat website [4].

2.5 Products

The Normalized difference vegetation index (NDVI), proposed by Rouse [5], is one of the most widely used vegetation indices. This index is based on the distinctive radiometric behaviour of vegetation throughout certain spectral windows. Healthy vegetation shows a characteristic spectral signature with a clear contrast between the visible bands, especially the red band (0.630 - 0.680 μm) and near-infrared (0.845 - 0.885 μm). This marked difference between the absorption spectrum in the visible and near-infrared (NIR) of healthy vegetation allows for distinguishing it from those suffering some kind of stress (water stress, for example, caused by drought), in which there is less reflectance in the NIR and greater absorption in the visible. Thus we can conclude that the greater the contrast between the reflectance of both bands, the greater the vigour of the vegetation cover, a lower difference indicating unhealthy or sparse vegetation. On the other hand, the radiometric spectrum of soil usually does not show this clear difference between the above mentioned spectral bands and, therefore, NDVI makes difficult to distinguish between vegetation and bare soil [6]. To overcome this drawback, indices such as Soil Adjusted Vegetation Index-SAVI were created, in order to highlight the vegetation response and reduce that of the soil [7]. The NDVI is calculated using the expression proposed by Rouse [6] [8]:

$$NDVI = \frac{\rho_{NIR} - \rho_{red}}{\rho_{NIR} + \rho_{red}}$$

Where ρ = reflectance in the corresponding band.

2.6 Calculation of cadastral statistics

The system calculates automatically the basic statistical parameters: mean, maximum, minimum and typical deviation of NDVI values for each plot and each image received. The results are stored in a geodatabase postgis for exploitation by a web viewer.

2.7 Interoperability

Interoperability can be defined in different ways. For example, the Institute of Electrical and Electronics Engineers [9] defines interoperability as the ability of two or more systems to exchange information and to use the information exchanged. The system makes use of OGC

standard web services: SOS (Sensor Observation Service) is used to store and make available the in-situ data observations (Fig. 2).

3. Results and discussion

The NDVI are calculated for all available dates and plot level, for this initial study - 30.04.2013 to 08.09.2014- are available 26 images without clouds Table 2, (Fig. 3) from which one can follow the evolution the state of vegetation over one million registered plots. With the processing system is activated, the database of statistics on all parcels are updated every 16 days (Fig. 4).

4. Conclusions

The automatic processing of biophysical indicators Landsat 8 is a very interesting tool for monitoring crops irrigated allowing us monitoring the state of vegetation at plot level for the Region of Murcia.

5. Acknowledgments

This work has been done through the project "Telerieg – Remote sensing use for irrigation practice recommendation and monitoring in the SUDOE space" financed by Programme (SUDOE), which supports regional development through European Regional Development Fund (ERDF) co-financing of transnational projects.

6. References

- [1] INSPIRE 2007. Directive 2007/2/EC, Official Journal of the European Union, ISSN 1725-2555, L 108, Volume 50, 25 April 2007 (<http://www.ec-gis.org/inspire/>)
- [2] FGDC. 2015. Geospatial Metadata Standards. Accessed: 7 April. 2015. <http://www.fgdc.gov/>
- [3] Chuvieco E. 2002. Teledetección ambiental :La observación de la Tierra desde el espacio. Ariel, 586p. ISBN-8434480476. Barcelona. 2002
- [4] USGS. 2015. Accessed: 7 April. 2015. <http://landsat.usgs.gov/landsat8.php>
- [5] 52north. 2015. Accessed: 7 April. 2015
- [6] Rouse J.W., Haas R.H., Schell J.A., Deering D.W., Harlan J.C. 1974. Monitoring the vernal advancement of retro-radiation of natural vegetation. In: NASA/GSFC, Type III, Final Report, Greenbelt, MD, 371.
- [7] Karnieli A., Agam N., Pinker R.T., Anderson M.C., Imhoff M.L., Gutman G.G., Panov N., Goldberg A. 2010. Use of NDVI and land surface temperature for assessing vegetation health: merits and limitations. In: Journal of Climate. 23:618-633.

- [8] Sobrino J.A., Raissouni N., 2000. Toward remote sensing methods for land cover dynamic monitoring: application to Morocco. In: International Journal of Remote Sensing. 21(2).

<http://hdl.handle.net/10201/42748>

- [9] IEEE, 1990. Institute of Electrical and Electronics Engineers. IEEE Standard Computer Dictionary: A Compilation of IEEE Standard Computer Glossaries. New York, NY: 1990.

Probabilistic assessment of the influence of metrics and RCMs combination on rainfall projections in Spain

P. Olmos⁽¹⁾, S. García ⁽¹⁾, J. D. Giraldo ⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidad Politécnica de Cartagena, Grupo de I+D+i Gestión de Recursos Hídricos, Unidad Predepartamental de Ingeniería Civil. Paseo Alfonso XIII, 52. 30203. Cartagena, España. patricia_olmos@live.com

⁽²⁾ Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Ingeniería Civil. Bogotá, Colombia.

Resumen

Los modelos hidrológicos exhiben gran sensibilidad a la precipitación. Esta es una de las principales razones para intentar mejorar las proyecciones de precipitación provistas por los Modelos Climáticos Regionales (RCMs en inglés). En el presente trabajo, se han desarrollado metodologías innovadoras para la generación de combinaciones o *ensemble* multimodelo de RCMs, permitiendo reducir las incertidumbres asociadas al cambio climático. Se realizó un análisis de sensibilidad a partir de multimodelos de precipitación, teniendo en cuenta dos formulaciones diferentes del factor de fiabilidad (R). La primera formulación se basa en funciones de distribución estacionales y anuales, mientras que la segunda considera funciones de distribución mensuales. Se ha evaluado la bondad del ajuste mediante dos métricas diferentes. Desde los resultados obtenidos, se ha identificado el método más robusto en la construcción probabilística de ensembles de precipitación para el período 1961-1990. Desde las proyecciones, se vislumbran plausibles disminuciones de las precipitaciones medias anuales para el periodo 2021-2050 en la España Peninsular. En conclusión, el método desarrollado facilita el estudio de los cambios en el patrón espacio-temporal de precipitaciones proyectadas para regiones de gran extensión.

Palabras clave: cambio climático; ensemble PDF; Península Ibérica.

Abstract

Hydrologic models are recognised to be highly sensitive to rainfall. It is one of the main reasons to improve the projections of rainfall provided by Regional Climate Models (RCMs). In the present work, innovative methodologies are developed to build RCMs ensemble as a way for reducing the involved uncertainties of climate change. A sensitivity exercise from multimodel rainfall ensemble, considering two different formulations of the reliability factor (R), is performed. The first method is based on seasonal and yearly cumulative distribution functions (CDFs), while the second one relies on monthly CDFs. The goodness of fit is evaluated considering two different metrics. The most robust method for building rainfall CDFs of rainfall PDF ensemble, for time period 1961-1990, is identified. The results indicate that a widespread decrease throughout continental Spain of the mean annual rainfall, for 2021-2050 period, is projected. In conclusion, the proposed tool appears to provide more confidence in the RCM-projections related to the spatio-temporal changes in rainfall over extended regions.

Keywords: climate change; ensemble PDF; Iberian Peninsula.

1. Introducción

La Península Ibérica es un área sometida a contrastes estacionales extremos. Como resultado de las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero y su ubicación geográfica, se esperan grandes cambios en la temperatura y las precipitaciones a lo largo del siglo. Para España, varios autores pronostican impactos negativos en la precipitación. Una disminución sustancial de aproximadamente el 30%, al final del siglo, con un patrón no uniforme en el espacio y el tiempo es previsto [1]. Además, una disminución plausible de precipitaciones superior al 15% sobre la Península Ibérica durante la estación húmeda se ha pronosticado [2].

En los últimos años, para aumentar la confiabilidad de las proyecciones climáticas e hidrológicas, metodologías de conjuntos de Modelos Climáticos Regionales (RCMs en inglés) consistentes en la producción de Funciones de Densidad de Probabilidad o Funciones de Distribución Acumulativa (PDF o CDF), se están llevando a cabo. En España, diferentes estudios se han realizado utilizando los conjuntos de RCMs en los períodos secos [3-5]. Sin embargo, son pocos los intentos para reproducir la precipitación media con conjuntos de RCMs sobre la Península Ibérica [6].

El objetivo principal de este trabajo es mejorar la confiabilidad de las proyecciones de series temporales de precipitación en España. Para

alcanzar este objetivo, dos metodologías innovadoras de conjuntos de RCMs se construyeron, usando promedios ponderados, donde el peso del modelo depende en medida alguna del rendimiento, y se consideraron dos métricas diferentes para medir el rendimiento del modelo. Los métodos fueron evaluados en base a su capacidad de reproducir la variabilidad espacial de las precipitaciones, mensual y estacional, para el periodo de referencia. Una vez seleccionado el mejor método, se presentan y se comentan los cambios plausibles proyectados entre el periodo de referencia y el horizonte temporal 2021-2050.

2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio y bases de datos

España se caracteriza por una compleja orografía, influenciada por ambos climas atlántico y mediterráneo. Estos factores producen una variabilidad del clima local marcado con un gradiente significativo de precipitación Noreste-Sureste, con valores superiores a 1600 mm/año en el Oeste de los Pirineos, la costa Cantábrica y la región de Galicia, hasta valores inferiores a 250 mm/año en el Sureste.

Las bases de datos meteorológicas observadas de precipitación correspondieron a Spain02 (período 1950-2007) de la Península Ibérica, con una resolución espacial de 20 por 20 km [7]. Los RCMs fueron proporcionados por el Proyecto Europeo ENSEMBLE [8]. Se trabajó con los diecisiete modelos seleccionados para realizar estudios en España [3], todos con un tamaño de celda de 25 por 25 km, escenario de emisiones A1B y periodo 1961-2050.

2.2 Cálculo del PDF ensemble

El método REA (Reliability Ensemble Averaging) [9] proporciona una medida de la fiabilidad, la media y el rango de incertidumbre del cambio climático simulado a partir de conjuntos de RCMs. En este trabajo se presenta una modificación del método original con el fin de mejorar algunas limitaciones. Esencialmente, el nuevo modelo abandona el uso del criterio de convergencia a futuro como ya hizo otro autor [10] y se mejora la forma en que se calculan los pesos del modelo. Los cálculos del factor de fiabilidad del modelo R_i están basados en funciones de distribución acumuladas empíricas (e-CDF) estacionales y anual (Eq. 1) o mensuales (Eq. 2), y una medida cuantitativa del grado de

ajuste entre las funciones de probabilidad. Los e-CDF fueron construidos desde datos observados y RCMs para el periodo de control 1961-1990.

$$R_{estacional\ i} = (R_{inv} R_{pri} R_{ver} R_{oto} R_{anual})^{\frac{1}{5}} \quad (1)$$

$$R_{i(mensual\ i)} = (R_{ene} R_{feb} R_{mar} R_{abr} R_{may} R_{jun} R_{jul} R_{ago} R_{sep} R_{oct} R_{nov} R_{dec})^{\frac{1}{12}} \quad (2)$$

Las métricas para estimar el desempeño de los modelos corresponden al valor p del test de bondad de ajuste Smirnov-Kolmogorov (SK) para dos muestras [11], y al índice de habilidad (Score) propuesto por Perkins [12]. Como ejercicio de sensibilidad, hemos considerado cuatro formulaciones diferentes de R_i , correspondientes a distintas combinaciones de las métricas y de las ecuaciones (Tabla 1).

La probabilidad asociada a un cambio simulado por el RCM es proporcional a R_i . El factor de fiabilidad normalizado P_m [9] puede ser interpretado como la probabilidad asociada a cada RCM. Por último, para la construcción de ensembles, se le dio más peso a los RCM con mayor P_m , utilizando técnicas de bootstrapping.

3. Resultados y Discusión

3.1 Evaluación del impacto de las diferentes metodologías ensemble en la precipitación

Dos metodologías fueron utilizadas para calcular el factor R_i : $R_{estacional}$ y $R_{mensual}$. Por lo tanto, es útil evaluar la sensibilidad a los diferentes supuestos.

Los mapas de R_i dan una idea general sobre la fuerza de cada RCM para modelar la precipitación sobre todos los sitios de la red. Por ello, se contrastó la distribución espacial de los valores de $R_{estacional}$ ($R1$) con los mapas de $R_{mensual}$ ($R3$) para cada RCM, construidos ambos con la métrica del test de SK (resultados no mostrados). En ambos casos, los mapas muestran distribuciones espaciales muy similares, pero el rango de valores de $R_{mensual}$ va de valores inferiores a 0.001 hasta 0.6, con valores excepcionalmente superiores a 0.6, sin embargo, el rango de valores de $R_{estacional}$ abarca desde valores de 0.2 a valores superiores a 0.8.

También se han analizado los mapas de R_i para la métrica S_{score} (no mostrados). De nuevo se observan diferencias en la dispersión entre los mapas $R_{estacional}$ ($R2$) y $R_{mensual}$ ($R4$).

3.2 Evaluación del impacto de las diferentes métricas en la precipitación

Se han presentado dos métricas para calcular los pesos en el PDF ensemble: valor p del test de SK y Sscore. Los parámetros utilizados para evaluar el acuerdo del PDF dan valores entre [0,1], siendo la unidad el acuerdo perfecto entre los PDF de los modelos y los PDF de los datos observados.

La principal diferencia que se encontró entre las métricas utilizadas fue que el valor p de SK (R1) tiene valores abarcando varias escalas, mientras que los valores Sscore (R2) están contenidos en una escala comparable general.

Además, la similaridad distribucional entre el ensemble y los datos observados con los CDFs de lluvia fue estudiada en detalle. Cuando la métrica utilizada es p de SK (R1), el CDF observado y ensemble reflejan una notable bondad de ajuste en la mayoría de los sitios. Esto no ocurre, sin embargo, si la métrica es Score (R2).

Después de calcular los ensembles, para completar el estudio de las diferentes métricas, se construyeron los mapas de diferencias de la media (test T), anuales y estacionales, entre la precipitación observada y la simulada. En la Fig. 1 se muestran los mapas de diferencias de medias anuales para el período 1961-1990 de todos los casos. Se puede observar, que los mapas obtenidos con la métrica Sscore (R2 y R4) presentan mayores diferencias (%) que con p de SK (R1 y R3) en todo el territorio español, y además muestran una mayor zona donde las diferencias son significativas (áreas sombreadas). A pesar de las diferencias entre las métricas, ambos enfoques sugieren que el verano es la temporada en la que se obtuvieron diferencias menos significativas (no mostrado), y que los mapas anuales mostraron las mayores diferencias.

Si se tiene en cuenta los esquemas ensemble, se observa que entre R1 y R3 hay diferencias, obteniéndose mejores resultados cuando se trabaja con la *Restacional*.

3.3 Evaluación de tendencia para el escenario de precipitaciones (2021-2050)

Una vez analizadas las distintas combinaciones, y escogida R1, pues es la que mejores resultados de precipitación ensemble ofreció para el período 1961-1990, se proyectaron los cambios de precipitación para el período 2021-2050. En la Fig. 2, se observan disminuciones significativas del valor medio de precipitación para prácticamente todo el territorio español, a

excepción de algunas áreas de la submeseta norte, Sistema Ibérico, la depresión del Ebro y el sureste. Las mayores disminuciones se prevén en el suroeste de España.

4. Conclusiones

Desde los resultados obtenidos, se concluye que el parámetro clave en el análisis de sensibilidad realizado resultó ser la métrica. Siendo por tanto el ensemble de precipitación mucho más sensible a este parámetro, obteniéndose mejores resultados con la p de SK. Con respecto al esquema del ensemble, se deducen mejores resultados cuando se emplea *Restacional*. De ambos análisis se puede concluir, que la combinación de métrica y esquema que ofrece una mejor bondad en el ajuste de las funciones de distribución, para el período de referencia fue R1. Por último, este multi-modelo ensemble (escenario A1B) fue el empleado en la generación de las proyecciones. Una plausible disminución en las precipitaciones medias para el horizonte 2021-2050, se espera para el territorio español.

5. Agradecimientos

Se agradece el soporte recibido desde el proyecto CGL2012-39895-C02-01 Evaluación de variabilidad hidroclimática desde combinaciones multimodelo climáticas regionales (HYDROCLIM), financiado por la Secretaría de Estado de Investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (España), y fondos FEDER.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Osca J., Romero R., Alonso S. 2013. Precipitation projections for Spain by means of a weather typing statistical method. *Global and Planetary Change* 109, 46–63
- [2] Giorgi F, Bi X, Pal J. 2004. Mean, interannual variability and trends in a regional climate change experiment over Europe. II: climate change scenarios (2071–2100). *Clim Dynam* 23:839–858
- [3] Giraldo Osorio J. D., García Galiano S. G. 2012. Assessing uncertainties in the building of ensemble RCMs over Spain based on dry spell lengths probability density functions. *Clim Dyn* 40:1271–1290. DOI 10.1007/s00382-012-1381-5
- [4] Domínguez M, Romera R, Sánchez E, Fita L, Fernández J, Jiménez-Guerrero P, Montávez JP, Cabos WD, Liguori G, Gaertner MÁ (2013) Present-climate precipitation and temperature extremes over Spain from a set of high resolution

RCMs. Clim Res 58:149–164. doi:10.3354/cr01186

[5] López-Franca N, Sánchez E., Losada T., Domínguez M., Romera R, Gaertner M. A. 2014. Markovian characteristics of dry spells over the Iberian Peninsula under present and future conditions using ESCENA ensemble of regional climate models. *Clim Dyn*. DOI 10.1007/s00382-014-2280-8.

[6] Herrera S, Fita L, Fernández J, Gutiérrez JM. 2010. Evaluation of the mean and extreme precipitation regimes from the ENSEMBLES regional climate multimodel simulations over Spain. *J Geophys Res* 115(D21):D21,117. doi:10.1029/2010JD013936

[7] Herrera S., Gutierrez JM., Ancell R., Pons MR., Frias MD., Fernandez J. 2012. Development and analysis of a 50-year high-resolution daily gridded precipitation dataset over Spain (Spain02). *Int J Climatol*. doi:10.1002/joc.2256.

[8] Christensen J. H., Rummukainen M., and Lenderink G. 2009. Formulation of veryhigh - resolution regional climate model ensembles for Europe. In ENSEMBLES: Climate change and its impacts at seasonal, decadal and centennial timescales: Summary of research and results from the ENSEMBLES project, edited by: van der Linden, P. and Mitchell, J. F. B., Met Office Hadley Centre, FitzRoy Road, Exeter EX1 3PB, UK, 47–58.

[9] Giorgi F, Mearns LO. 2003. Probability of regional climate change based on reliability ensemble averaging (REA) method. *Geophys Res Lett* 30(12):311–314

[10] Xu Y., Gao X., Giorgi F. 2010. Upgrades to the reliability ensemble averaging method for producing probabilistic climate-change projections. *Clim Res* 41:61–81.

[11] Sheskin DJ. 2000. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures, 2nd edn. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.

[12] Perkins SE, Pitman AJ, Holbrook NJ, McAneney J. 2007. Evaluation of the AR4 climate models' simulated daily maximum temperature, minimum temperature, and precipitation over Australia using probability density functions. *J Clim* 20:4356–4376.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Diferentes formulaciones para el cálculo de R_i

Métodos	Parámetros
R1	$R_{estacional}$ y test SK
R2	$R_{estacional}$ y Sscore
R3	$R_{mensual}$ y test SK
R4	$R_{mensual}$ y Sscore

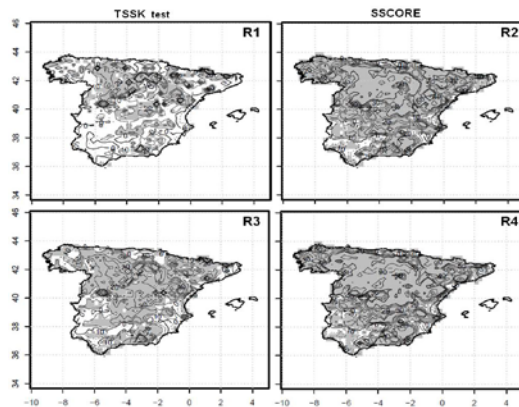


Figura 1. Mapas de diferencias de medias de precipitaciones para el periodo 1961-1990, evaluados como $[100 * (mapEns - mapObs) / mapObs]$. Las áreas sombreadas representan diferencias significativa (95% intervalo de confianza)

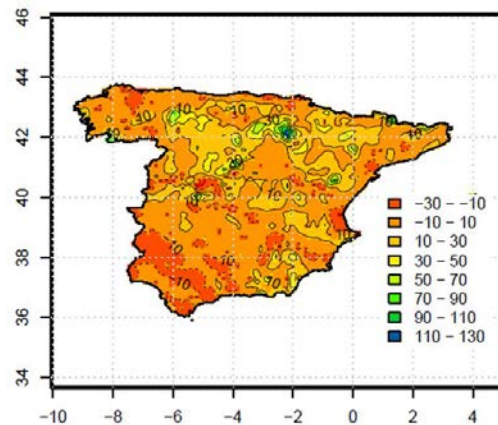


Figura 2. Mapa de porcentaje de cambio de precipitaciones medias, evaluado como $[100 * (mapEns_{2021-2050} - mapObs_{1961-1990}) / mapObs_{1961-1990}]$.

Evapotranspiration estimates from vegetation indices

J.A. Martínez⁽¹⁾, S. Garcia⁽¹⁾, A. Baille⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidad Politécnica de Cartagena. Unidad Predepartamental de Ingeniería Civil, Grupo de I+D Gestión de Recursos Hídricos. Paseo Alfonso XIII, 52, 30203 Cartagena. España. joseangel.martinez@upct.es

⁽²⁾ Universidad Politécnica de Cartagena. Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Paseo Alfonso XIII, 52, 30203 Cartagena. España

Resumen

En este trabajo se presenta una metodología de estimación de la evapotranspiración real (ET_a) de la superficie terrestre a escala mensual a partir de imágenes de satélite de observación de la Tierra (MODIS Terra). Se basa esencialmente en el uso de un índice de vegetación (EVI, Enhanced Vegetation Index) y de datos de temperatura del aire. El método se ha validado con medidas de ET_a obtenidas por el método de covarianza de remolinos en dos parcelas de naranjos del Campo de Cartagena (Murcia). Esta metodología presenta la ventaja de ser poco exigente en datos de entrada, lo que la convierte en una herramienta idónea para aproximaciones de ET_a a escala de cuenca.

Palabras clave: Teledetección; reflectancia; balance hídrico

Abstract

This work presents a method for estimating the actual transpiration (ET_a) of land surfaces from data provided by Earth Observation satellites (MODIS Terra). The method uses a vegetation index (EVI, Enhanced Vegetation Index) and air temperature data. It was validated with ground measurements of ET_a performed by the eddy-covariance technique in two citrus orchards of Campo de Cartagena (Murcia). The proposed method presents the advantage of being little demanding in input data, therefore representing a suitable tool to get estimates of ET_a at the basin scale.

Keywords: Remote sensing; Reflectance; Water balance

1. Introducción

Un método ampliamente utilizado para el cálculo de la evapotranspiración de cultivos en condiciones óptimas (ET_c), es el propuesto por Allen *et al.* [2]. Se basa en el cálculo de la evapotranspiración de referencia (ET_{ref}) y del conocimiento del coeficiente de cultivo (K_c), específico a cada especie. La evolución de K_c a lo largo del ciclo de cultivo se basa en valores estándares definidas en función del estadio fenológico del cultivo (Allen *et al.* [2]). ET_c , se obtiene multiplicando ET_{ref} por K_c , y representa la evapotranspiración máxima de un cultivo en una zona climática determinada.

En condiciones reales, las plantas pueden estar sujetas a diferentes tipos de estrés bióticos (e.g. plagas) o abióticos (estrés hídrico, térmico o nutricional), y su evapotranspiración real (ET_a) es entonces inferior a ET_c . Allen *et al.* [2] proponen de introducir funciones de estrés para estimar ET_a .

En la última década, con la posibilidad de utilizar la información derivada de los satélites de observación de la Tierra, se han desarrollado métodos basados en índices de vegetación (VI).

Estos índices, derivados de medidas de reflectancia en diferentes longitudes de onda del espectro solar, caracterizan la densidad de vegetación y su estado de vigor, y pueden ser utilizados como sustitutos de K_c , para los cultivos como para la vegetación natural. El método es entonces similar al método de coeficiente de cultivo, sustituyendo K_c por una función del índice de vegetación elegido, $f(VI)$:

$$ET_{a,VI} = ET_{ref} f(VI) \quad (1)$$

La función $f(VI)$ se determina generalmente por ajuste de la función a medidas disponibles de ET_a en tierra.

Para la estimación de ET_{ref} se puede recurrir a una amplia gama de fórmulas, que difieren por su exigencia en datos meteorológicos. El método FAO-56 Penman-Monteith (PM) fue establecido como estándar para el cálculo de ET_{ref} [1], debido a su relativa exactitud y coherencia tanto en climas áridos como en climas húmedos. No obstante es un método que requiere un gran número de variables meteorológicas, no siempre disponibles. Además, para su determinación a partir de datos históricos, presenta como

inconveniente la falta de registros fiables, debido a los cambios en los dispositivos de medición y localización de estaciones [4]. En este contexto para determinar ET_{ref} en una serie histórica, es necesario recurrir a métodos poco exigentes en datos. Un método alternativo es la ecuación de Hargreaves (HG) [8], que sólo requiere datos de temperatura del aire, proporcionando estimaciones de ET_{ref} razonables con una validez global [1].

El principal objetivo de este trabajo es estimar ET_a a escala mensual para una serie temporal histórica correspondiendo a imágenes del satélite MODIS Terra comprendido entre el 2000 y 2013, a escala de cuenca hidrográfica (Cuenca del Segura, Sureste de España).

En una primera etapa, se ha estimado ET_{ref} mediante HG a partir de datos de temperatura. En una segunda etapa se ha estimado ET_a mediante la Ecuación 1, empleando el índice EVI (Enhanced Vegetation Index) de MODIS, ajustando los parámetros de la función $f(VI)$ de acuerdo a medidas de ET_a en dos parcelas de naranjos ubicadas en el perímetro de riego del Campo de Cartagena (Región de Murcia)

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Los datos de satélite empleados corresponden a los productos procedentes del sensor MODIS de la plataforma Terra, para el período 2000-2013. En concreto, se utilizó el producto MOD13Q1 que proporciona información espacial y temporal del estado de la vegetación mediante los índices de vegetación $NDVI$ (Normalized Difference Vegetation Index) y EVI (Enhanced Vegetation Index). Estos se proporcionan cada 16 días con una resolución espacial de 250 metros.

Además, se han utilizado datos de temperatura del aire obtenidos a partir del conjunto de datos meteorológicos SPAIN02 [7] para el período 2000-2007 con una resolución espacial de 20 km x 20 km interpolados a 250 m y completados temporalmente (período 2008-2013), con datos de estaciones meteorológicas automáticas de redes agrometeorológicas y redes de estaciones ordinarias (por ejemplo, sistema SAIH, y conjuntos de datos meteorológicos), interpolados a una resolución espacial de 250 x 250 m.

Para la validación de la metodología, se han utilizado medidas de ET_a del periodo comprendido entre Junio 2009 y diciembre 2011 llevadas a cabo

en dos fincas comerciales de naranjos, situadas en el Campo de Cartagena: Villa Antonia (Parcela A) y Casa Mulero (Parcela B). Se trata de parcelas de naranjos, regados por goteo. En la parcela A, son árboles de 30 años de edad, con marco de plantación de 6 m x 4 m, e índice de área foliar (IAF) del orden de 5. En la Parcela B, los árboles son de 6 años de edad, regados por goteo con marco de plantación de 4,5 m x 3 m, e IAF del orden de 3. Ambas parcelas están equipadas con torres de flujos que miden directamente y en continuo ET_a con la técnica de covarianza de remolinos (eddy-covariance).

2.2 Metodología

- EVI

Con respecto a $NDVI$, el índice EVI tiene las ventajas de minimizar la influencia del suelo y mantener una cierta sensibilidad en condiciones de vegetación densa. EVI se expresa como:

$$EVI = \frac{G \cdot (\rho_{NIR} - \rho_{RED})}{(\rho_{NIR} + C1 \cdot \rho_{RED} - C2 \cdot \rho_{BLUE} + L)} \quad (2)$$

donde ρ_{NIR} es la reflectancia en el infrarrojo cercano; ρ_{RED} : reflectancia en el rojo; ρ_{BLUE} : reflectancia en el azul; los coeficientes son: $L=1$, $C1=6$, $C2=7.5$.

- ET_{ref}

La ecuación de Hargreaves [9] requiere la temperatura máxima y mínima del aire, así como la radiación extraterrestre. El promedio mensual (mm día^{-1}) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$ET_{ref} = C \cdot R_a (T_{max} - T_{min})^{0.5} (T + 17.8) \quad (3)$$

donde C es un coeficiente empírico, R_a el promedio mensual de la radiación extraterrestre diaria- (mm/día), calculado de acuerdo a [1]; T_{max} y T_{min} son los valores mensuales promedio máximo y mínimo de la temperatura del aire ($^{\circ}\text{C}$); y T es la temperatura diaria promedio mensual, calculado como la media de T_{max} y T_{min} .

- ET_a

Se ha elegido la función $f(VI)$ propuesta por Nagler *et al.* [6] y Guerschman *et al.* [3]:

$$f(VI) = [a \cdot (1 - e^{(-b \cdot EVI)}) - c] \quad (4)$$

donde a , b y c son coeficientes de ajuste. La función $(1 - e^{(-b \cdot EVI)})$ es similar a la ley de Beer-Lambert que predice la absorción de la radiación solar por un dosel vegetal [5]. Por consecuencia,

EVI sustituye a *IAF*, asumiendo una relación lineal entre *EVI* y *IAF*.

3. Resultados y Discusión

A partir de las medidas de flujo en las parcelas de naranjo, se identificaron los parámetros de la ecuación (4), obteniendo la siguiente ecuación para estimar ET_a :

$$ET_a = ET_{ref} [0.98 \cdot (1 - e^{(-2.24 \cdot EVI)}) - 0.197] \quad (5)$$

La correlación entre los valores observados en las torres de flujo y los valores estimados muestran un resultado satisfactorio (Fig.1). Para la Parcela A, existe una alta correlación ($R^2=0.80$) Sin embargo para la Parcela B, la correlación es menor ($R^2=0.47$), debido a que se tratan de árboles más jóvenes y más espaciados, por lo que la influencia del suelo introduce distorsiones en la observación. La Tabla 1 presenta los parámetros estadísticos que caracterizan la precisión con la que se ha estimado ET_a : MAE (Error Medio Absoluto Medio), MAPE (Error Absoluto Porcentual Medio) y EMC (Error Medio Cuadrático).

Ejemplos de distribuciones espaciales de ET_{ref} y ET_a calculadas para la Cuenca del Segura son presentadas en la Fig. 2 para el mes de Diciembre del año 2010.

4. Conclusiones

En conclusión, se ha demostrado que el seguimiento de ET_a a escala mensual puede ser llevado a cabo empleando únicamente valores de reflectancias superficiales desde información satelital e información meteorológica fácilmente accesible (temperatura del aire). Se resalta como principal ventaja del método propuesto, frente a otros que consideran información desde bandas térmicas, su idoneidad para el seguimiento de ET_a para largos periodos, dada la baja variabilidad temporal de los *IV* en los que se basa. Por otro lado, el método propuesto permite solventar el problema de la falta de observación debida a la presencia de nubes y por tanto es una herramienta adecuada para aproximaciones de ET_a a escala de cuenca.

5. Agradecimientos

Se agradece el soporte recibido desde los proyectos: CGL2012-39895-C02-01, "Evaluación de variabilidad hidroclimática desde combinaciones multimodelo climáticas

regionales (HYDROCLIM)" financiado por MINECO y fondos FEDER; y EU DG-ENV Grant n° 07.0329 "Accounting System for the SEgura river and Transfers (ASSET)".

6. Referencias bibliográficas

- [1] Allen R.G., Pereira L.S., Raes D., Smith M., 1998. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrig Drain. paper No 56. FAO. Rome
- [2] Allen R.G.; Clemmens A.J., Burt C.M., 2005. Prediction accuracy for project-wide evapotranspiration using crop coefficients and reference evapotranspiration. J. Irrig. Drain. Eng. 131. 1–24.
- [3] Guerschman J.P., Van Kijk I.J.M., Mattersdorf G., Beringer J., Hutley L.B., Leuning R., Pipunic R.C., Sherman B.S., 2009. Scaling of potential evapotranspiration with MODIS data reproduces flux observations and catchment water balance observations across Australia. J. Hydrol. 369. 107–119.
- [4] Maestre Valero J.F., Martínez Alvarez V., González Real M.M., 2013. Regionalization of the Hargreaves coefficient to estimate long-term reference evapotranspiration series in SE Spain. Spanish J. Agric. Res. 11(4):1137-1152.
- [5] Nagler P., Glenn E., Thompson T., Huete A., 2004. Leaf area index and Normalized Difference Vegetation Index as predictors of canopy characteristics and light interception by riparian species on the Lower Colorado River. Agric. For. Meteorol. 116. 103–112.
- [6] Nagler P., Scott R., Westenburg C., Cleverly J., Glenn E., Huete A. 2005. Evapotranspiration on western US rivers estimated using the Enhanced Vegetation Index from MODIS and data from eddy covariance and Bowen ratio flux towers. Remote Sens. Environ. 97. 337–351.
- [7] Herrera S., Gutiérrez J.M., Ancell R., Pons M.R., Frías, M.D., Fernández J., 2010. Development and analysis of a 50-year high-resolution daily gridded precipitation dataset over Spain (Spain02). In: Int. J. Climatol. 32.1. pp. 74-85
- [8] Hargreaves G.H., Samani Z.A., 1985. Reference crop evapotranspiration from temperature. Appl. Eng. Agric. 1(2): 96-99.
- [9] Hargreaves G.H., 1994. Defining and using reference evapotranspiration. J. Irrig. Drain Eng. 120(6): 1132-1139.

Tablas y Figuras

Tabla 1. MAE, MAPE, EMC

Error	Parcela A	Parcela B
MAE (mm/d)	0.30	0.43
MAPE (%)	15.63	24.45
EMC (mm/d)	0.37	0.54

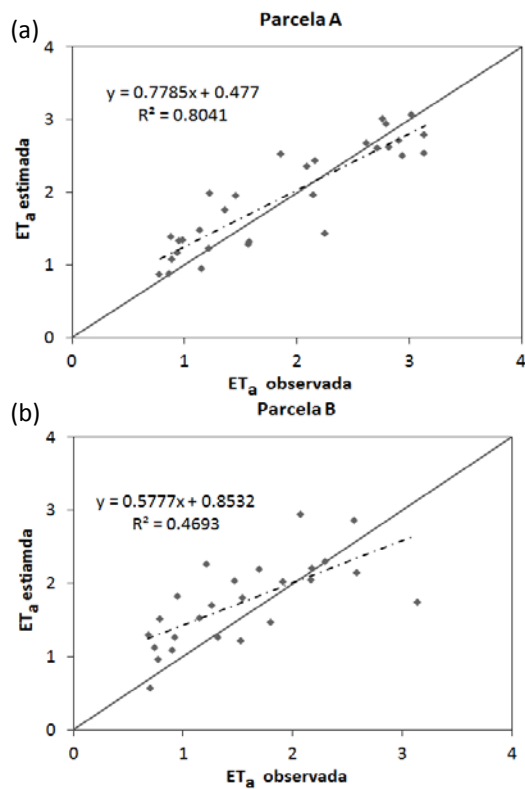


Figura 1. Relación entre valores observados y estimados de ET_a en (a) Parcela A y (b) Parcela B.

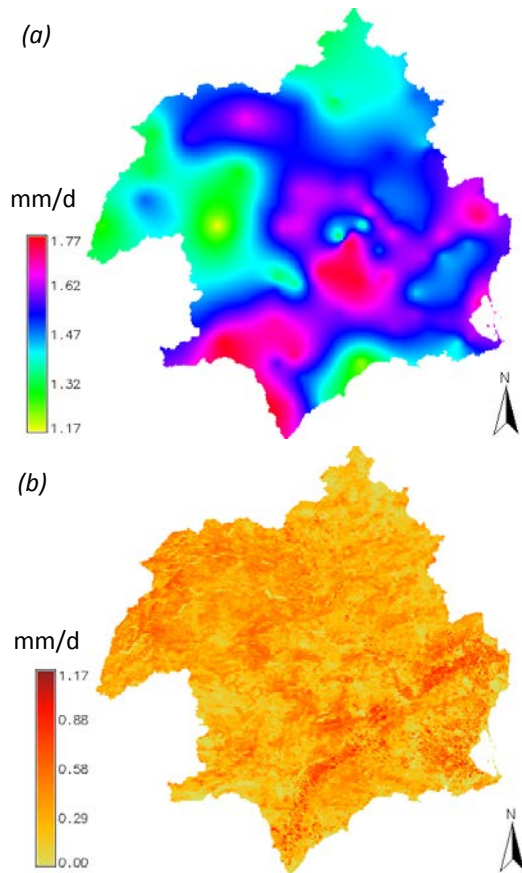


Figura 2. Mapa de (a) ET_{ref} y (b) ET_a (Fecha: 12/2010)

Water balance estimation of the Campo de Cartagena watershed using hydrological modeling and remote sensing

J.E. Hunink⁽¹⁾, S. Contreras⁽¹⁾, A. Baille⁽²⁾

⁽¹⁾ FutureWater, Paseo Alfonso XIII, 48, Cartagena, email: j.hunink@futurewater.es

⁽²⁾ Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, Cartagena

Abstract

This work uses hydrological modeling and remote sensing techniques to estimate the spatial and temporal patterns of the water balance of an intensively irrigated agricultural watershed in south-eastern Spain. Remote sensing-based vegetation indexes were used to estimate crop evapotranspiration rates and as an input in the model. Model outcomes give insight in the overall water account of the watershed. They highlight the critical role of the groundwater system in the water balance, and the differences between abstractions and recharge, depending on the hydrological conditions.

Keywords: simulation models; earth observation data; water accounts; groundwater recharge

1. Introduction

Imbalances between water supply and demand and competition among different water sectors are increasing in many water-stressed basins in the world [1], [2]. However, in many cases, decision makers in the water sector lack good access to information on the basin scale where important decisions need to be made and a complete picture of the basins status is necessary [3], [4]. This information at the watershed level is a prerequisite for identifying, and for proposing strategies of water management compatible with the environmental constraints of semiarid agricultural Mediterranean watersheds [5], [6].

To build water balances for semiarid agricultural watersheds, many data on fluxes and stocks are often hardly or not available. Remote sensing methods can be of assistance in estimating some of these components in combination with hydrological modelling [7]–[9] and can in some cases be the only way to close the water budget [10], [11].

The overall aim of this study is to assess how the water balance of an intensively irrigated watershed in south-eastern Spain is influenced by human interventions. The study uses a hydrological model in combination with remote sensing data to estimate the water balance of the Campo de Cartagena basin in south-eastern Spain. The analysis should provide insight in the spatial and temporal water balance patterns, with special emphasis on groundwater recharge and groundwater abstractions.

2. Methods

2.1 Study area

The Campo de Cartagena basin is located in SE Spain, in the Murcia region (Figure 1). It has a size of 1218 km² and drains to the Mar Menor lagoon. The NW and SW borders of the basin are mountainous areas of relatively low altitude (highest point at 1071 m a.s.l.). The basin has an average altitude of 151 m a.s.l. and is relatively flat (average slope 7.5%). Climate is semiarid with a strong Mediterranean regime. Mean annual precipitation is 300 mm, and mean annual temperature ranges from 14°C to 17°C. Potential evapotranspiration averages 1275 mm/y. For a more detailed description of the area see [12].

A major part of the basin is used for agriculture, of which 30% for irrigated agriculture (35,000 ha). The most important irrigated crops are citrus trees (oranges and lemon) and horticultural row crops (lettuce, broccoli, melon and others). In plots dominated by row crops, rotation of autumn-winter (e.g. lettuce, artichoke) and spring-summer (e.g. melon) crops is a very common practice. Drip irrigation is the main irrigation system in the study region.

2.2 Modeling approach

The soil-water balance model was built upon the SPHY (*Spatial Processes in Hydrology*) model [13]. SPHY is a raster-based soil bucket-water balance approach which simulates the soil water dynamics in the root zone based on the conservation mass equation. For more details on the model specifications, please refer to the model description in [13].

An algorithm for retrieving actual evapotranspiration rates based on a satellite-

based vegetation index (VI) was developed within this study and integrated in SPHY. The approach combines observations of green foliage density with meteorological data to estimate evaporation from transpiring vegetation and has been applied for several applications [9], [14]. Here, the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) is used as a direct surrogate of the stress factors which affect the vegetation/crop performance and, thus, the crop coefficient (k_c). A simple linear parameterization for the VI- k_c relationship was used in which the minimum values for the crop coefficient ($k_{c,min}$) are reached in bare soils, and the maximum ones ($k_{c,max}$) are expected to be reached when vegetation/crop is growing at its optimum agronomic condition, i.e. when the NDVI is close to the maximum value observed for a non-stressed coverage.

Other input datasets into the model were the land use dataset from the SIOSE geodatabase (www.siose.es), detailed soil maps with different soil parameters prepared by the CEBAS-CSIC institute, and meteorological data from all operational meteorological stations in the basin managed by the Segura Basin Authority (CHS), the Regional Ministry of Agriculture (SIAM) and the Spanish Meteorological Agency (AEMET). The period covered was October-2000 to September-2012. The spatial resolution for the analysis was 250 m. Calibration of the hydrological model took place using data on evapotranspiration from two Eddy Covariance Systems in the basin. For more detail on the modelling approach, please refer to [11].

3. Results and Discussion

The hydrological model SPHY was applied using 10 years of remote sensing data and calibrated using the evapotranspiration data. Spatial and temporal outputs were analysed (see [11]). The physical water balance was summarized at the basin scale. *Figure 2* shows the water accounting diagram for average conditions. The diagram shows the main fluxes and distinguishes between irrigated agriculture and the non-irrigated part of the basin (mix of rainfed agriculture and natural vegetation).

Figure 2 shows that during the study period, a mean annual volume of 61 hm³/year was delivered from the Tajo-Segura aqueduct, while 104 hm³/year was pumped from the groundwater system. The model estimated the potential recharge from irrigated areas at 66 hm³/year. This recharges mainly the upper Quaternary aquifer, which is connected to the

Mar Menor lagoon. It is known that there is some connection with the lower confined aquifers, but fluxes are yet insecure. Potential recharge is somewhat lower for the non-irrigated areas. Runoff is low (4 hm³/year), assuming that finally most of the water entering the drainage network infiltrates.

On average, a little bit more than half of crop water consumption was met with irrigation inputs, while the remaining was met by rainfed soil moisture. The relative contribution of rainfed soil moisture to the total evapotranspiration ranged between 35-70% along the study period. As expected, a negative relationship was found between irrigation requirements and rainfall: the drier the year, the higher the requirements of irrigation inputs to the system.

Figure 3 shows the same diagram but for a dry year, with precipitation amounts about half of the average. For this particular year, surface water supply from the Tajo-Segura transfer was higher than average. But due to low rainfall amounts, groundwater abstractions were also higher than average (131 hm³/year). Potential recharge is lower (30 hm³/year), mainly due to low rainfall amounts.

4. Conclusions

Based on the remote sensing-based hydrological modelling exercise, this study showed that more than half of crop water consumption comes from irrigation water. Of this, a major part comes from groundwater (65%), while the rest comes from basin-transferred water. So the water balance estimation confirms that groundwater is a critical source for irrigation water in the Campo de Cartagena agroecosystem.

On average, groundwater abstractions are about similar to the potential groundwater recharge amounts. During a dry year, groundwater abstractions can be even about 4 times the recharge rate. However, recharge happens to the quaternary aquifer, which has a connection with the Mar Menor lagoon, while it is only slightly connected with the deeper aquifers.

6. References

- [1] Wada Y., Bierkens M.F.P. 2014. Sustainability of global water use: past reconstruction and future projections. *Environ. Res. Lett.* 9: 104003.
- [2] Green T.R., Taniguchi M., Kooi H., Gurdak J.J., Allen D.M., Hiscock K.M., Treidel H., Aureli A. 2011. Beneath the surface of global change:

Impacts of climate change on groundwater. *J. Hydrol.* 405: 532–560.

[3] Van Eekelen M.W., Bastiaanssen W.G.M., Jarman C., Jackson B., Ferreira F., van der Zaag P., Saraiva Okello A., Bosch J., Dye P., Bastidas-Obando E., Dost R.J.J., Luxemburg W.M.J. 2015. A novel approach to estimate direct and indirect water withdrawals from satellite measurements: A case study from the Incomati basin. *Agric. Ecosyst. Environ.* 200: 126–142.

[4] Cheema M.J.M., Immerzeel W.W., Bastiaanssen W.G.M. 2014. Spatial quantification of groundwater abstraction in the irrigated Indus basin. *Ground Water.* 52: 25–36.

[5] Contreras S., Jobbágy E.G., Villagra P.E., Noretto M.D., Puigdefábregas J. 2011. Remote sensing estimates of supplementary water consumption by arid ecosystems of central Argentina. *J. Hydrol.* 397: 10–22.

[6] Daccache A., Ciurana J.S., Rodriguez Diaz J.A., Knox J.W. 2014. Water and energy footprint of irrigated agriculture in the Mediterranean region. *Environ. Res. Lett.* 9: 124014.

[7] Ahmad M.D., Bastiaanssen W.G.M., Feddes R.A. 2004. A new technique to estimate net groundwater use across large irrigated areas by combining remote sensing and water balance approaches, Rechna Doab, Pakistan. *Hydrogeol. J.* 13: 653–664.

[8] Castaño S., Sanz D., Gómez-Alday J.J. 2009. Methodology for Quantifying Groundwater Abstractions for Agriculture via Remote Sensing and GIS. *Water Resour. Manag.* 24: 795–814.

[9] Contreras S., Jobbágy E.G., Villagra P.E., Noretto M.D., Puigdefábregas J. 2011. Remote sensing estimates of supplementary water consumption by arid ecosystems of central Argentina. *J. Hydrol.* 397: 10–22.

[10] Taghvaeian S.C., Neale M.U. 2011. Water balance of irrigated areas: a remote sensing approach. *Hydrol. Process.* 25: 4132–4141.

[11] Contreras S., Hunink J.E., Baille A. 2014. Building a Watershed Information System for the Campo de Cartagena basin (Spain) integrating hydrological modeling and remote sensing. *FutureWater report 125.*

[12] Baudron P., Barbecot F., Aróstegui J.L.G., Leduc C., Travi Y., Martinez-Vicente D. 2014. Impacts of human activities on recharge in a multilayered semiarid aquifer (Campo de Cartagena, SE Spain). *Hydrol. Process.* 28: 2223–2236.

[13] Terink W., Lutz A.F., Simons G.W.H., Immerzeel W.W., Droogers P. 2015. SPHY v2.0: Spatial Processes in HYdrology. *Geosci. Model Dev. Discuss.* 8, no. 2 : 1687–1748.

[14] Glenn E.P., Neale C.M.U., Hunsaker D.J., Nagler P.L. 2011. Vegetation index-based crop coefficients to estimate evapotranspiration by remote sensing in agricultural and natural ecosystems. *Hydrol. Process.* 25: 4050–4062.

Figures

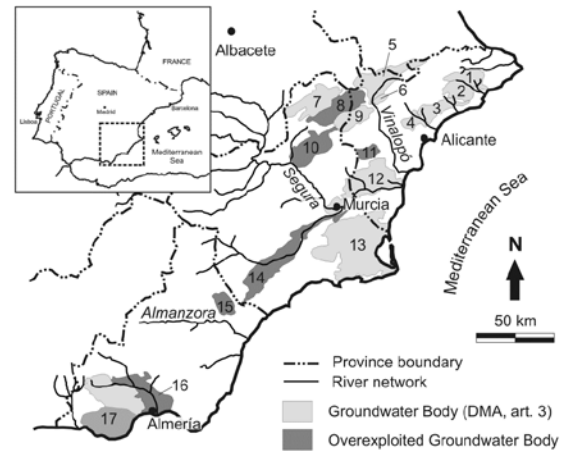


Figure 1. Location of the Campo de Cartagena basin

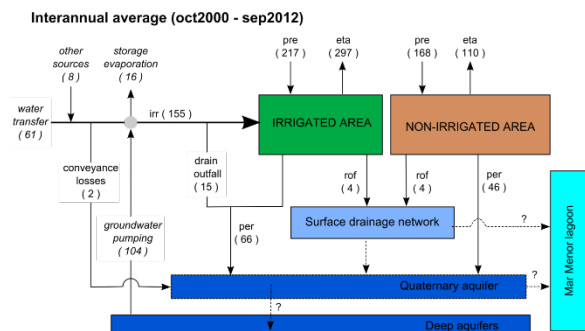


Figure 2. Water accounting diagram for the Campo de Cartagena basin. Mean annual values for the Oct2000-Sep2012 period.

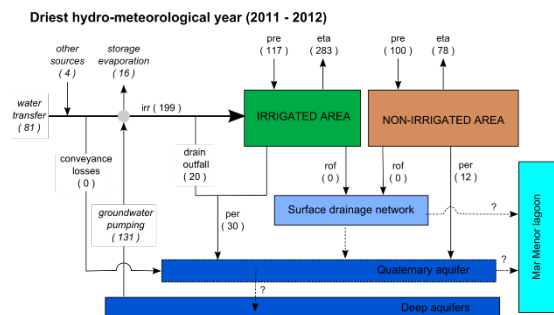


Figure 3. Water accounting diagram for the Campo de Cartagena basin during the driest hydrological year.

Cloud computing management in lysimetric stations with automatic supervision of digital images

J.M. González-Esquiva⁽¹⁾, J.A. Vera-Repullo⁽²⁾, L. Ruiz-Peñalver⁽¹⁾,
M. Jiménez-Buendía⁽²⁾, J.M. Molina-Martínez⁽¹⁾

⁽¹⁾ Grupo I+D+i Ingeniería Agromótica y del Mar. DIAEA. Área de Ingeniería Agroforestal. ETSIA Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena (Murcia). jm.gonzalez@telenaturaebt.es

⁽²⁾ Departamento de Tecnología Electrónica. Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena (Murcia)

Resumen

Con el avance de la tecnología han ido desarrollándose diferentes aplicaciones para el control y gestión de riego, desde los robustos dataloggers a los avanzados cRIO, permitiendo incluso por medio de módulos de comunicación y/o servidores web embebidos la visualización de los datos para ser visualizado por los usuarios. Como inconveniente presentan la utilización de diferentes lenguajes de programación y normas de funcionamiento que dificulta la integración de los diferentes sistemas de riego, el consumo de ancho de banda disponible y la limitación de memoria. Por medio de la presente investigación se ha realizado una novedosa aplicación PHP capaz de importar diferentes datos desde dataloggers y/o cRIO de forma autónoma, al utilizar protocolos estándar de comunicación (XML, JSON, CSV), además de incorporar un módulo para obtener de forma desatendida y automática la cobertura vegetal a partir de una fotografía digital. La aplicación está integrada en un sistema cloud computing que procesa los datos, pudiendo calcular las necesidades hídricas del cultivo utilizando algoritmos matemáticos, almacenar los datos para ser monitorizados y visualizados por cualquier dispositivo con navegador de Internet o exportarlos a un sistema de control de riego, por medio de protocolos estándar de comunicación.

Palabras clave: PHP; gestión de riego; segmentación.

Abstract

With the technological advances, different applications for irrigation control and management have been developed. From the robust dataloggers to the advanced cRIO, the user data display is allowed by these devices by means of communication modules and/or embedded Web servers. The disadvantage of these devices is the use of different programming languages and functioning standards. This is a difficulty because of the integration of different irrigation systems, the available bandwidth consumption and the limitation of the memory. By means of the current development a novel PHP application is presented. This application is capable of import different data from dataloggers and/or cRIO with autonomous ways. This is due to the use of standard communication protocols (XML, JSON, CSV). Moreover a module for obtaining the vegetal coverture by means of an unattended and automatic way from a digital photography is incorporated. The application is integrated in a cloud computing system that processes the data. The crop water needs can be calculated using mathematical algorithms. Data can be collected to be monitored and visualised by any device with Internet browser. Additionally, data can be exported to irrigation management systems by means of communication standard protocols.

Keywords: PHP; irrigation management; segmentation.

1. Introducción

En los últimos años se ha producido un gran avance en las comunicaciones vía internet, siendo cada vez más habitual aplicaciones capaces de funcionar de forma remota en la comúnmente llamada nube [1], realizando operaciones cada vez más complejas y posibilitando almacenar nuestros datos en la nube de cualquier dispositivo conectado en la red.

En la actualidad los dataloggers almacenan los datos y comparten la información por medio de módulos de conexión remota, pero con el inconveniente de no poder hacer configuraciones complejas de gestión.

Con el empleo de aplicaciones SCADA embebidas en controladores compactos como el cRIO, tenemos la opción de configurar todo el proceso de gestión, visualización y supervisión de los datos in situ[2], [3], aunque este tipo de configuración requiere un gran consumo de datos. En estos casos, las aplicaciones generan un

elevado tráfico de datos, siendo necesaria una conexión wifi dentro de la finca y del empleo de internet explorer con módulo o alojar el SCADA en un servidor externo que importe los datos.

Para realizar el cálculo de las necesidades hídricas de un cultivo se requiere conocer la evapotranspiración real del cultivo (ET_c) pudiéndose obtener con lisímetros de pesadas, al establecer el balance hídrico entre el agua suministrada (riego y lluvia) y el agua drenada en una unidad de tiempo[4]. Estos datos también pueden ser calculados aplicando técnicas de fotografía digital pero con el inconveniente de que se deben ajustar las ecuaciones para cada zona, ciclo y tipo de cultivo [5]. A pesar de estas limitaciones, se puso de manifiesto el interés por tener una supervisión visual remota del estado del cultivo, en continuo, que permitiera estudiar la evolución del crecimiento del cultivo y ayudar en la gestión adecuada del mismo.

En este artículo se presenta el desarrollo de un software ejecutado en un sistema cloud computing, para su empleo comercial en explotaciones hortícolas.

La aplicación es capaz de medir, almacenar, monitorizar y gestionar el riego de cultivos hortícolas con total exactitud, y en tiempo real, a partir del balance hídrico obtenido mediante lisimetría de pesada, contrastando los valores con los obtenidos mediante la utilización de cámaras digitales de forma autónoma.

2. Materiales y Métodos

2.1 Servidor Web en hosting.

Para la realización del software se ha dispuesto de un servidor donde se ha instalado un sistema LAMP [6], (Linux, Apache, MySQL y PHP) y un servidor de hosting LAMP económico implementado con el mismo software.

Se ha empleado un módulo en PHP con la librería CURL (Curl Corporation, 2008) alojado en los servidores, capaz de gestionar datos de entrada en JSON (JavaScript Object Notation) [7] y ser leído por cualquier lenguaje de programación, permitiendo el intercambio de información entre distintas tecnologías.

2.2 Estación de lisimetría.

Los datos utilizados durante el ensayo y evaluación de la plataforma de gestión del riego en la nube mediante lisimetría de pesada, fueron obtenidos de la Estación de Lisimetría ubicada en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela, que

dispone de varios lisímetros cuyos datos son recogidos con un datalogger modelo CR1000 (Campbell Scientific) y un controlador compacto tipo cRIO compacto 9076 (cRIO-9076, National Instruments) [8]. En ambos equipos se implementó una rutina de salida en JSON con los valores de los cuatro sensores de las células de carga, fecha y hora, nº lisímetro. El envío de datos se realizó, en tiempo real, a través de gprs/3G/4G y Ethernet.

2.3 Gestión fotográfica

Se ha desarrollado un módulo realizado en PHP con librerías Imagick, que almacena y cuantifica la cobertura vegetal de forma desatendida y automática. Tras recibir la fotografía digital, el sistema encuadra la foto y tras aplicar un algoritmo basado en una segmentación por histograma y Fuzzy C-Means[9], siguiendo los siguientes pasos(Fig. 1).

Paso1. Corrección de la imagen, aplicando una transformación para corregir la distorsión por ángulo de visión o lente.

Paso 2. Transformación de colores a un espacio de colores RGB 256 y reducción de tamaño a una escala prefijada.

Paso 3.Construcción de un histograma, uno para cada componente de color de la imagen. Para cada histograma, aplicación sucesiva del filtro de espacio-escala y construcción de un árbol de intervalo de cruces por cero en la segunda derivada en cada escala. Análisis del espacio-escala para determinar qué picos o valles del histograma son más predominantes, de esta forma se determinarán los intervalos principales.

Paso 4. Cálculo de las clases con intervalos en cada componente de color, asignando los píxeles a cada clase única si se encuentra dentro de los intervalos estipulados, etiquetándose como “clasificado” en el caso afirmativo, asignándole un número de clase única.

Paso 5. A los grupos de píxeles de un tamaño mayor a un parámetro predefinido que no han podido ser clasificados por el proceso anterior, serán asignados a una clase por medio de la técnica FCM. El objetivo es encontrar patrones o grupos en un determinado conjunto de datos, que permitan asociar los píxeles no clasificados con la clase más afín.

Paso 6. Conversión a formato bicolor, determinándose los elementos estructurantes principales que incluyen los grupos que estén

relacionados con el cultivo y los que están relacionados con el color de fondo correspondiente a la tierra.

Paso 7. Erosión y dilatación. [10]. A partir de los elementos estructurantes principales, se eliminan por erosión aquellos grupos de píxeles que estén fuera de los objetos y se incluyen por dilatación aquellos píxeles que se encuentren en el interior de los objetos.

Paso 8. Se enumeran los píxeles correspondientes de vegetación entre el número total de píxeles, obteniéndose así el factor de cobertura.

3. Resultados y Discusión

3.1 Transmisión de datos.

Al realizar un volcado remoto de los datos del datalogger, 8700 registros en un tiempo total de 7 minutos, con un tiempo medio de 5 centésimas de segundo por registro por medio de una conexión 3G.

3.2 Reconocimiento de fotografías.

Se procedió a enviar al sistema 116 fotografías de baja resolución (200x200 píxeles) (50-60 kb) correspondientes a cuatro parcelas, obteniéndose la evolución de la cobertura vegetal con un error máximo del 3% respecto a los datos obtenidos de forma manual, con un tiempo de computación por fotografía comprendido entre 0,6 y 0,7 segundos.

3.3 Monitorización y visualización de datos.

Se ha realizado una interface sencilla donde se pueden apreciar los diferentes datos y resultados, siendo accesible desde cualquier dispositivo con navegador con internet. (Fig. 3, Fig. 4).

4. Conclusiones

Al instalar el sistema en la nube, con un pequeño consumo de datos por parte del sistema de gestión de la finca y el servidor, y al utilizar protocolos estándar de comunicación, JSON, se ha conseguido reducir el tráfico de datos, respecto al SCADA de gestión del riego embebido en el controlador compacto a través de conexión 3G,

Al estar programado en PHP. Se ha podido integrar los algoritmos para el reconocimiento de imágenes digitales, pudiéndose incorporarse los datos tanto de forma manual como programada.

5. Agradecimientos

Esta investigación se llevó a cabo gracias al apoyo del Grupo I+D+i Ingeniería Agromónica y del Mar de la Universidad Politécnica de Cartagena. Asimismo, agradecemos a la empresa TeleNatura EBT por su colaboración.

6. Referencias bibliográficas

- [1]Keahey K., Figueiredo R., Fortes J., Freeman T., Tsugawa M. 2008. Science Clouds: Early Experiences in Cloud Computing for Scientific Applications. *Cloud computing and applications*. 825–830.
- [2]Vera-Repullo J. A., Ruiz-Peñalver L., Jiménez-Buendía, M., Rosillo J. J., Molina-Martínez J. M..2014.Software for the automatic control of irrigation using weighing-drainage lysimeters. *Agric. Water Manag.* 151:4–12.
- [3]Jiménez-Buendía M., Ruiz-Peñalver L., Vera-Repullo J.A., Intrigliolo-Molina D.S., Molina-Martínez J.M. 2014. Development and assessment of a network of water meters and rain gauges for determining the water balance. New SCADA monitoring software. *Agric. Water Manag.* 151:93-102.
- [4] López-Urrea R., Montoro A., Mañas F., López-Fuster P., Fereres E. 2012. Evapotranspiration and crop coefficients from lysimeter measurements of mature ‘Tempranillo’ wine grapes. *Agric. Water Manag.* 112: 13–20.
- [5] Escarabajal-Henarejos D., Molina-Martínez J. M., Fernández-Pacheco D. G., Cavas-Martínez F., García-Mateos G. 2015. Digital photography applied to irrigation management of Little Gem lettuce. *Agric. Water Manag.*, 151: 148–157.
- [6] Ramana U. V., Prabhakar T. V. 2005. Some experiments with the performance of LAMP architecture. En: *The Fifth International Conference on Computer and Information Technology (CIT’05)*. 916–920.
- [7] Bray T. 2014.The JavaScript Object Notation (JSON) Data Interchange Format.
- [8] Ruiz-Peñalver L., Vera-Repullo J. A., Jiménez-Buendía M., Guzmán I., Molina-Martínez J. M. 2015. Development of an innovative low cost weighing lysimeter for potted plants: Application in lysimetric stations. *Agric. Water Manag.* 151:103–113.
- [9] Bezdek J.C., Ehrlich R., Full W. 1984. FCM: The fuzzy c-means clustering algorithm. *Computers & Geosciences*. 10:191–203.
- [10] Pérez C.M., Padilla D.C. 2014, Segmentación automática en imágenes RGB aplicando la técnica Fuzzy C-means de la morfología matemática para

la ayuda de la fotoidentificación de cetáceos. Computing Science. 74:131-142.

vegetal Fc(%) obtenida con una edición manual y por otra parte utilizando la Edición Automática

Tablas y Figuras

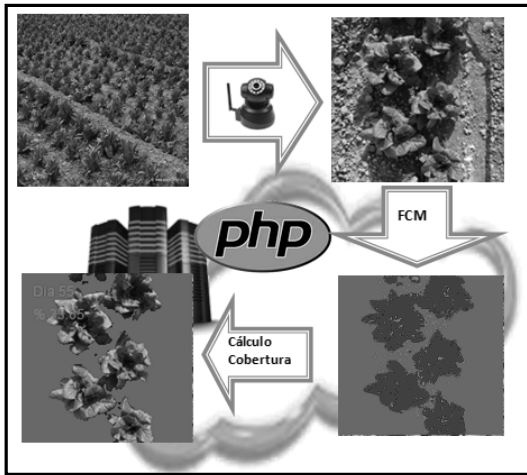


Figura 1. Proceso de segmentación y obtención de cobertura vegetal a partir de una imagen digital

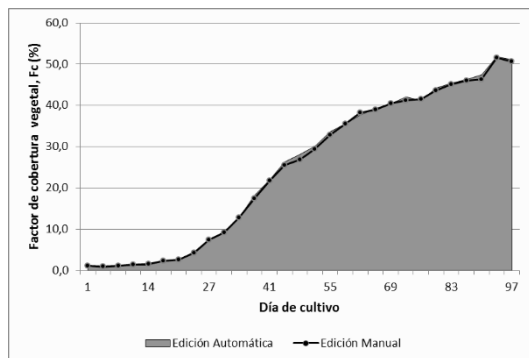


Figura 2. Gráficas que muestran la evolución (días de cultivo) de la fracción de cobertura

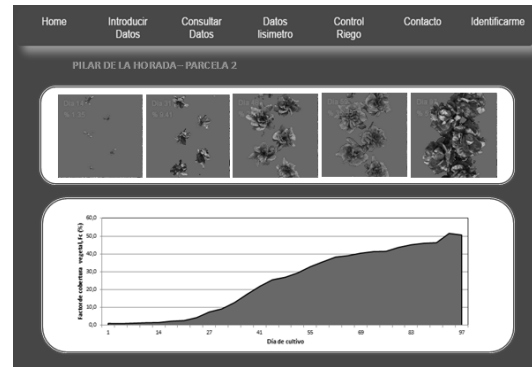


Figura 3. Captura de pantalla que muestra las imágenes procesadas y un gráfico con la evolución de la cobertura vegetal.

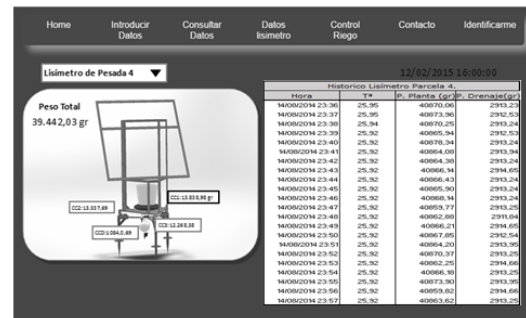


Figura 4. Pantalla que muestra adquisición de datos de las células de carga del lisímetro y una tabla con el registro histórico de datos.

Sustainable management assessment of a historical urban green space through the ecosystem services provided: Contingent Valuation Method

S. Gómez, F.J. Alcón

Departamento de Economía de la Empresa, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, España. E-mail: samu.ct@gmail.com

Resumen

En este estudio se ha evaluado la sostenibilidad de la gestión de un bien público, como es el caso del Jardín Histórico "El Huerto de las Bolas" en la ciudad de Cartagena, a través de la comparación los costes de su mantenimiento con los beneficios derivados de su uso. La estimación de los beneficios se ha llevado a cabo mediante la aplicación del Método de Valoración Contingente (MVC), que permite estimar de forma conjunta los servicios históricos, culturales, arquitectónicos, paisajísticos y ambientales del Jardín. Los resultados muestran que la disposición a pagar máxima media es de 7.89 €/año, que para el conjunto de los habitantes de la ciudad supone un beneficio de 1.735M€/año. Si estos beneficios se comparan con los gastos de mantenimiento del jardín y de la gestión turística del mismo se deduce que los beneficios derivados del mantenimiento en buenas condiciones del jardín proporcionarán unos beneficios superiores a los costes.

Palabras Clave: Jardín Histórico El Huerto de las Bolas; servicios ecosistémicos; parques y jardines.

Abstract

This study aims to evaluate the sustainability of a public good management, such as the Historical Garden "El Huerto de las Bolas" located in Cartagena, by comparing the maintenance costs and the benefits derived from its use. The estimation of its benefits was carried out by applying the Contingent Valuation Method (CVM), which allows estimating, in an integrative way, the historical, cultural, architectural, landscaping and environmental services of the Garden. Results show the maximum average willingness to pay is €7.89/year, which means a benefit of €1,735/year for all the city inhabitants. If these benefits are compared to the garden maintenance cost and the tourism management cost, we can conclude that the benefits resulting from a proper garden maintenance will be higher to its maintenance costs.

Keywords: Historic Garden El Huerto de las Bolas; ecosystem services; parks and gardens.

1. Introducción

La valoración económica de los costes y beneficios asociados a bienes públicos en general, o del medio ambiente en particular, es una herramienta útil para asignar un valor a aquellos bienes para los que no existe un mercado, como es el caso de los espacios verdes urbanos.

Los métodos de valoración económica permiten poner racionalidad a las decisiones que se tomen teniendo en cuenta toda la información disponible, tanto de costes como de beneficios, venga o no del mercado del que pertenece. En este sentido, la valoración económica de los espacios naturales hay que entenderla como un instrumento para la toma de decisiones por parte de las administraciones públicas relacionadas con su conservación [1]. En definitiva, la valoración de los atributos ambientales debe ser tomada en cuenta para garantizar una gestión sostenible de los recursos escasos.

La inexistencia de mercados reales en los que intercambiar la mayoría de bienes y servicios medioambientales que proveen los Parques y Jardines hace difícil conocer el valor económico de muchas funciones que son aprovechadas por la ciudadanía, el turismo y la sociedad en general, o la repercusión que puede tener en el bienestar variaciones de la cantidad o calidad del servicio. Este hecho, por tanto, hace necesaria la utilización de técnicas de valoración económica que permitan averiguar el citado valor a partir de la obtención directa de las preferencias personales de los individuos hacia el citado ecosistema que, en este caso en concreto, es un Jardín Histórico.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es estimar los beneficios proporcionados por un ecosistema urbano y compararlos con los costes de su mantenimiento. Para lograr este objetivo se utilizará el Método de Valoración Contingente (MVC), para la estimación de los beneficios, y el método de mercado, para la estimación de los costes. La zona de estudio es la ciudad de

Cartagena, concretamente, el Jardín Histórico del Huerto de las Bolas, que cuenta con más de 100 años de historia y con un estilo arquitectónico singular.

No es frecuente encontrar en la literatura valoraciones asociadas a parques o jardines, siendo escasos los estudios que abordan la valoración de los beneficios que suponen estos espacios urbanos para sus usuarios. Así, desde el punto de vista académico, este trabajo contribuye a ampliar el conocimiento de los beneficios proporcionados por los ecosistemas urbanos. Desde el punto de vista de la gestión de estos espacios, los resultados del trabajo proporcionarán información muy útil a los gestores públicos encargados de la toma de decisiones asociadas a estos espacios urbanos.

2. Materiales y Métodos

El método de VC es un método directo de valoración económica, tal y como señalan Azqueta y Ferreiro [2] que afirman que *“en aquellas ocasiones en que no se puede establecer un vínculo entre la calidad de un bien ambiental y el consumo de un bien privado, el método de valoración contingente puede ser el único utilizable”*. Además, este método permite determinar la disposición a pagar (DAP) por los usuarios del jardín en cuestión y el grado de influencia de otras características de los ciudadanos sobre esta disposición al pago. La forma de obtener estas variables ha sido mediante un sistema de encuestas, a través de las cuales se ha podido recabar la información necesaria para la valoración de los beneficios proporcionados por el Jardín.

4.1. La encuesta y su elaboración

La elaboración de la encuesta tiene como fin obtener una estimación del bien en cuestión, por lo que se debe de definir, de forma precisa, cuál es el cambio en el recurso que se quiere valorar. El escenario de valoración se ha planteado considerando el mantenimiento del jardín. Por ello, la pregunta de valoración se ha centrado en si el encuestado estaría dispuesto a pagar una tasa en concepto de entrada por poder visitar este jardín en las condiciones más óptimas posibles.

Para la elaboración de la encuesta se han tomado como referencia las consideraciones efectuadas en el *“informe sobre Valoración Contingente de la NOAA”* [3]. La pregunta de valoración ha sido formulada en formato abierto, atendiendo a las

recomendaciones de Mitchell y Carson [4]. El vehículo de pago utilizado fue el pago de una entrada al parque.

Las preguntas de la encuesta se estructuraron buscando 3 objetivos: (1) Conocer aspectos generales del tipo de usuario encuestado y su percepción del jardín; (2) plantear el escenario y pregunta de valoración; (3) conocer la situación socioeconómica de los encuestados.

4.2. Toma de datos

Tras comprobar el buen funcionamiento de la encuesta a través de la realización de un test inicial, la toma de datos se realizó de manera aleatoria a 30 personas en varias zonas de la ciudad de Cartagena. Estos datos son una muestra parcial, con caracteres exploratorio, y orientados a mejorar el diseño y toma de datos de una nueva muestra representativa de la población.

4.3. Tratamiento estadístico de datos

Para modelizar la DAP de los encuestados y realizar un análisis de heterogeneidad de preferencias entre encuestados, se ha utilizado un modelo Tobit, dado que este se adapta mejor a la acumulación de valores de DAP nulos que las regresiones lineales estándar [5]. En el modelo Tobit, ampliamente utilizado en este tipo de trabajos [6,7] la variable dependiente es restringida alrededor de un cierto valor (en este caso el valor cero [8]). La especificación del modelo viene dada por la siguiente expresión:

$$y_i = \{y_i^* \text{ si } y_i^* > 0, 0 \text{ sino}\} \quad (1)$$

donde y_i es la DAP del encuestado y donde y_i^* es el valor latente de la DAP del encuestado. Esta expresión representa la situación en la cual respuestas cero son generadas del mismo procedimiento que las respuestas no nulas que representan la compensación del exceso. El valor esperado de la variable latente y_i^* y los efectos marginales de las variables independientes del modelo se expresan como:

$$\begin{aligned} E(y_i^* | x_i) &= \beta' x_i \\ \partial E(y_i^* | x_i) / \partial x_i &= \beta \end{aligned} \quad (2)$$

donde x_i es el vector de las variables explicativas y β es el parámetro que determina el impacto de la variable explicativas sobre la DAP.

4.4. Descripción de variables

La Tabla 1 muestra la medición de las variables recogidas en la encuesta que afectan a la DAP.

3. Resultados y Discusión

Para estimar el valor de los servicios proporcionados por el Jardín Histórico se ha estimado la cantidad de dinero que los ciudadanos están dispuestos a pagar como máximo (DAP_{max}) para mantenerlo en buenas condiciones. Por término medio, la DAP asciende a 1.21€/visita, que considerando el número de visitas que realizaría el entrevistado con este precio asciende a 7.89€/año. Para el agregado de la ciudad, el valor de los servicios proporcionados por el ecosistema del Huerto de las Bolas asciende a 1.735M€ anuales.

Al realizar el análisis de heterogeneidad de la demanda por los servicios de los ecosistemas urbanos, empleando un del modelo Tobit (Tabla 2). Se han encontrado numerosas variables significativas que afectan sobre la DAP_{max} . Así, las variables que influyen de manera positiva sobre la DAP están relacionadas con aquellos ciudadanos que conocen el jardín, que lo visitan con mayor intensidad, que tiene hogares de mayor tamaño y tienen niños. El sexo también influye sobre la DAP apreciándose en el modelo que las mujeres están dispuestas a pagar más que los hombres.

Como era de esperar, aquellos ciudadanos que perciben que el grado de conservación es mejor están dispuestos a pagar menos que los que consideran un peor estado de conservación. Sin embargo, otras variables han mostrado un efecto negativo sobre la DAP, como el año de nacimiento, indicando que aquellos ciudadanos más jóvenes están DAP menos por estos servicios. La distancia al jardín, también influye de forma negativa sobre la DAP. Este resultado resulta evidente dado que aquellos ciudadanos que viven más cerca del jardín perciben un mayor valor sobre los servicios que este proporciona.

Inesperadamente, los encuestados con estudios universitarios están dispuestos a pagar menos que el resto de niveles de estudios. Y aunque se esperaba que aquellos ciudadanos con un mayor nivel de ingresos contribuyeran de forma positiva sobre la disposición al pago, la estimación del coeficiente de esta variable ha resultado ser no significativa.

Si se considera que los gastos de mantenimiento anuales del jardín, compuesto por el mantenimiento del jardín (185.000 €·año⁻¹) y gestión turística del jardín (100.000 €·año⁻¹), se puede apreciar que los beneficios estimados por los ciudadanos sobrepasan claramente los costes de su provisión. De hecho, los beneficios

percibidos por el 25,91% de la población de la ciudad, sin contar con el turismo, ya cubrirían los gastos destinados para este jardín al año.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos señalan que los beneficios que proporciona este espacio verde urbano histórico superan a los costes derivados del mantenimiento y gestión turística del mismo, lo que justificaría a su vez la dotación de recursos humanos y económicos sobre este tipo de bienes públicos.

Los resultados sugieren que la percepción de estos beneficios varía en función de las características de los entrevistados, pudiéndose determinar que parte de la población recibe un mayor beneficio de los servicios ecosistémicos proporcionados por estos espacios verdes.

Estos resultados, obtenidos con carácter exploratorio, permiten determinar el valor que supone un bien como es un jardín histórico, con su idiosincrasia dentro de una ciudad. Y es por ello por lo que es necesaria una mayor extensión de este estudio a un mayor número de zonas verdes, y a un mayor número de ciudadanos, que aumente la solidez de los resultados y permita obtener recomendaciones útiles para que los gestores públicos puedan realizar un uso sostenible de estos espacios.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Barberán R., Egea P., Pérez y Pérez L. 1997. "Los costes sociales de la política de protección de la naturaleza. Aproximación metodológica a su estimación". IX Encuentro de economía pública, febrero, Vigo, España.
- [2] Azqueta D., Ferreiro A. 1994. Análisis económico y gestión de los recursos naturales. Ed: Alianza Editorial. Madrid, España.
- [3] Arrow K., Solow R., Portney P., Leamer E., Radner R., Schuman H. 1993. Report of the NOAA Panel on contingent valuation. Federal Register 58 (4602- 4614): 42-46.
- [4] Mitchell R.C., Carson, R.T. 1989. Using surveys to value public goods: The Contingent Valuation Method. Ed: Resources for the future. Washington DC.
- [5] Seung-Hoon Y., Seung-Jun K., Tai-Yoo K. 2000. Dealing with zero response data from contingent valuation surveys: application of least absolute deviations estimator. Appl Econ Lett 7: 181-184.

[6] Adams C., Seroa da Motta R., Ortiz R., Reid J., Ebersbach C., Almeida P.A. 2008. The use of contingent valuation for evaluating protected areas in the developing world: economic valuation of Morro do Diabo State Park, Atlantic Rainforest, São Paulo State Brazil. *Ecol Econ* 66: 359-370.

[7] Amemiya T. 1984. Tobit models: a survey. *J Econometrics* 24: 3-61.

[8] Tobin J. 1958. Estimation of relationships for limited dependent-variables. *Econometrica* 26: 24-36.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Variables definidas en la encuesta que afectan a la DAP

Variables		Indicadores
Nombre	Descripción	
POP	Popularidad del Jardín Histórico del "Huerto de las Bolas"	[1] Conoce [0] No conoce
VISITA	Visita del Jardín	[1] Si [0] No
ESTADO	Estado del Jardín	[1] Estado precario ... [4] Buen estado
SEXO	Sexo del encuestado	[1] Hombre [0] Mujer
AÑO_NAC	Año de nacimiento	Valor unitario del año de nacimiento
N_PERS_+18	Nº personas adultas por vivienda	Valor unitario del número de personas adultas
NIÑOS	Familias con uno o más niños	[1] Si [0] No
DIST	Distancia al Jardín (Km)	[1] < 1 [2] 1 - 10 [3] 10 - 50 [4] 50 - 100 [5] 100 - 500

Variables		Indicadores
Nombre	Descripción	
		[6] 500 - 1000 [7] 1000 - 4000 [8] > 4000
		[1] Sin estudios [2] Graduado escolar [3] Bachiller o FP [4] Universitarios
		[1] <500 [2] 500 - 1.000 [3] 1.001 -1.500 [4] 1.501 - 2.000 [5] 2.001 - 2.500 [6] 2.501 - 3.000 [7] 3.000 – 6.000 [8] > 6.000
INGRESOS	Ingresos mensuales (€)	

Tabla 2. Resultados del modelo Tobit

Variable	Coef.	Desv. Típica	t	P> t
POP	0.26	0.14	1.79	0.09
VISITA	0.44	0.15	2.88	0.01
ESTADO	-0.96	0.22	-4.45	0.00
SEXO	-1.28	0.21	-6.04	0.00
AÑO NAC	-0.08	0.02	-3.58	0.00
ADULTOS	1.86	0.38	4.87	0.00
NIÑOS	1.36	0.27	5.03	0.00
DIST	-0.26	0.07	-3.75	0.00
NIVEL E. UNIV.	-0.87	0.21	-4.06	0.00
INGRESOS	0.07	0.05	1.4	0.18
constante	154.27	43.05	3.58	0.00
Log likelihood	4.577			
LR chi2(10)	50.10			
Prob > chi ²	0.00			
Pseudo R ²	1.22			

Competitiveness of palm dates fruit of Tunisia in the Mediterranean region

R. Ben-Amor^(1,2), E. Aguayo⁽²⁾, M.D. de Miguel-Gómez⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Economía de la Empresa, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 32003. Cartagena (Murcia). Spain. E-mail: rihabenamor@yahoo.fr

⁽²⁾ Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 32003. Cartagena (Murcia). Spain.

Abstract

The date-palm cultivation and your trade are questions of clear strategic importance in terms of economic, social and environmental development in Tunisia. However, the globalization of markets has had a huge impact on the traditional concept of the comparative advantage enjoyed by Tunisia in date exports. In fact, an analysis of the competitive advantage of the Tunisian date industry in the Mediterranean area and Iran over the last 20 years shows that Tunisia is still the main supplier of dates to the EU. The Deglet-Nour variety puts to Tunisia ahead of traditional competitors such as Algeria and Iran, with average of competitiveness indices as BIS 6405.99, DI 17.38, CMS 41.04 and TBI 99.50 are more stable than those countries during the studied period. But it is currently facing new competitors like Israel and re-exporting countries like France. New business strategies (conditioning, new non-chemical treatments, packing, opening new markets, new distribution channels) would be positive responses to tackle current market limitations, the emergence of new producers and restrictive EU policies.

Keywords: competitive indices; date palm sector; export-import; Mediterranean countries.

1. Introduction

The Tunisia accession to membership of the World Trade Organization (WTO); and the Free Trade Agreement with the European Union (EU) in 1995, has marked the foreign trade policy in Tunisia. Within this context, the food industry has been facing new challenges arising from free trade and greater access of the Tunisian economy to the rest of the world. This has led companies in this sector to improve both their performance and competitiveness.

The agricultural and food policy in Tunisia has focused on the maximization of production, thus agricultural activities were first carried out according to national guidelines and objectives of self-sufficiency in terms of food, and subsequently food safety, by supporting production prices and subsidizing most agricultural inputs [1].

Globalization has made companies worldwide more competitive. Omoregie and Thomson [2] informed that competitiveness is a relative concept; therefore there is a need for a measurement framework that will help to systematically evaluate all comparable factors thought to be relevant in the pertinent economic activities. This concept can be analyzed through competitive advantage, in this line; this work proposes to study the competitive position of a

strategic sector in the Tunisian economy as palm date sector.

The economic importance of date-palm in Tunisia is reflected in the date-growing area, which covered over 51,000 hectares in 2011 [3]. This extension has been steadily increasing over the past 20 years, doubling between 1990 and 2010, and is the sixth most widespread area in the world, after Saudi Arabia, Algeria, Iran, Iraq and Morocco.

Tunisia is considered leader in the production and export of cv. Deglet-Nour [4], which has specific organoleptic characteristics (flavor, color, texture...), with over 73% of its production, and over 85% of exports. This cultivar is *par excellence* the most marketed in Europe, since about 90% of dates imported to the EU are 'Deglet-Nour', and 90% of these are imported from Tunisia and Algeria. The latter is Tunisia's main competitor, with the remaining 10% being supplied by Israel and the USA, emerging producers of this variety.

Given the importance of palm date sector in the Tunisian economy and the different technical problems that limit its trading system, we analyzed Tunisian competitive position of this sector in relation to its main competitors in the Euro-Mediterranean area and Iran, insomuch as more than 88% of production and 70% of world trade take place there, determining by the

degree of specialization and dependence, trade balance, analysis of market share.

2. Methodology

[5] reported that on microeconomic theory one assumes that there exists a market constituted by a group of commodities. The commodities compete in the same market when the goods are substitutable for the consumer or the producer, which is the case of palm date fruit, in the Mediterranean area.

2.1 Balassa's revealed comparative advantage index (RCA).

$$RCA_{ij} \text{ or } BIS_{ij} = \frac{\left(\frac{x_{ij}}{\sum x_j}\right)}{\left(\frac{x_j}{\sum x_j}\right)} \quad (1)$$

Where: x_{ij} represents exports from country i for product j ; $\sum x_j$ represents exports of all products of country i ; x_j represents exports of product j in a reference area; and $\sum x_j$ represents exports of all products of the reference area.

This index varies between 0 and $+\infty$, values <200 indicate that country i is relatively less specialized in the sector j than the reference area, or is at a disadvantage compared to the reference area. For values >200 , we can say that participation of the sector j in the structure of exports from country i is higher than that observed in the reference area, whereby one can state that the said country is strongly specialized in this sector.

2.2 Dependency ratio (DR).

$$DR_{ij} = \frac{\left(\frac{m_{ij}}{\sum m_j}\right)}{\left(\frac{M_j}{\sum M_j}\right)} \times 100 \quad (2)$$

Where: m_{ij} represents imports from country i for product j ; $\sum m_j$ represents imports of all products from country i ; M_j represents imports of product j in the reference area; and $\sum M_j$ represents imports of all products from the reference area.

For this index, one can compare the structure of imports of a country within the reference area. If it is >100 for sector i , one can say that participation in the said sector in the structure of imports of country j is higher than that observed in the reference area.

This index does not have to be correlated with the specialization index of RCA, since there is no relationship between the two indices [6].

2.3 Constant market share (CMS).

$$CMS_{ij} = \left(\frac{x_{ij}}{x_m}\right) \times 100 \quad (3)$$

Where: x_{ij} represents exports from country j of product i ; x_m represents exports of the geographical area taken as a reference of a product i .

Is an approach that analyzes trade patterns and trends in order to formulate policies, the technique identifies the factors underlying the results of comparative export of a country [7]. This method disaggregates trade data of the countries surveyed and compares trade flows around the world.

2.4 Trade balance index (TBI).

$$TBI_{ij} = \left[\frac{X_{ij} - M_{ij}}{X_{ij} + M_{ij}}\right] \times 100 \quad (4)$$

Where: X_{ij} and M_{ij} represent exports and imports, respectively, of country i for product j .

The TBI value varies between -100 (if a country only imports) and 100 (if a country only exports). Any value within -100 and $+100$ implies that the country exports and imports a commodity simultaneously. A country is referred to as "net importer" in a specific group of product where the value of TBI is negative and as "net exporter" where the value of TBI is positive.

3. Results and discussion

3.1 Balassa's revealed comparative advantage index (RCA).

Table 1a) show that Tunisia is the second most specialized country in date exports after Algeria. It presented specialization indices much higher than 200 throughout the study period, remaining more or less stable with a slight decline in the latter part of the study ($BIS = 5390.84$ in 2006-2010), exceeding the BIS of Egypt by 41 times on average during the study period (first producer of dates in the world), an average of 8 times that of Israel (whose improvement is ongoing) and an average of 3.3 times that of Iran (the second largest date producer in the world).

Fig. 1b shows that on analyzing the Tunisian date export (measured as the Exports/Production ratio), which gives an average of 33% over the 20

years studied and has been as high as 50% in recent years, we see that it greatly exceeds the export of Algeria, with an average of 3.5%, or Iran 7.4% and Israel 23% for the same study period. This means that Tunisia has made by far the greatest effort to export its dates to international markets, dominating with 26% of global date exports in the last decade [8].

3.2 Dependency ratio (DR).

The DR or relative advantage of imports [9] for Tunisia in the date sector ranged from 10 to 26 during the study period (Table 1b)). This is considered relatively low compared to Morocco (ranging from 160-1900), Jordan (300-500), France (105-201), Spain (58-80), and Italy (45-76), all considered major importers of dates.

Therefore, the fact that $BIS \gg 200$ and $DR \approx 0$, shows that Tunisia is strongly specialized in exporting dates, and has a high RCA compared to Mediterranean countries and Iran. Moreover, Algeria is its main competitor in international markets with its BIS descending in the last period, almost equal to the BIS of Tunisia. This is probably due to phytosanitary problems that affect levels of production and marketing of Algerian dates. Given this situation, Tunisia should seek to improve or at least maintain its competitive position in the future, solving the problem of dates. Moths mentioned above and considered the main threat of the date palm industry in Tunisia, and seek alternatives to chemical treatments to meet international and European standards, maintaining a low infestation rate and optimum product quality.

3.3 Constant market share (CMS).

Table 1c) shows that Tunisia ranks first in the Mediterranean, and is ahead of Iran for the time studied, with a CMS average of 41%. This score remained more or less stable throughout the observation time, with small progressive increases in one time to another, reaching a market share of 44% in the 2006-2010 period.

Iran ranked second in market share, which is considered important; however, it was unstable given the variation between one period and another, and with significant losses after 1996, dropping from 33% in the 1991-1995 period to an average of 24%, from 1996-2010. This probably reflects economic losses due to the progression of the red palm weevil in Iran.

In the Mediterranean, Algeria began in second place in market share criterion, but has declined drastically, dropping from 30% in 1991-1995 to

4.76% in 2006-2010. It has lost more than 25% of its CMS probably due to the decline in French imports, its main destination.

The remaining countries have a negligible share, such as Egypt with an average CMS of 1.40%, over the observation period, or Italy, Jordan, Turkey, Morocco and Spain, with an average CMS <0.5%.

3.4 Trade balance index (TBI).

Economic development is probably the most important policy objective in less developed countries and exports are often seen as an engine for growth [10]. Results of TBI given in Table 1d) confirm this concept and show that Tunisia is a net exporter of dates, with values greater than 0, and is very close to 100 (TBI average 99.59). Tunisia exports but does not import dates, or if it does so, in negligible quantities.

Likewise Iran, Israel and Algeria have TBI values that are equal or very close to 100, indicating a similar export structure and competitive advantage.

Egypt has an average TBI value of 65% during the study period, indicating that it is a net exporter. However, it also imports a significant amount of dates due to the large domestic demand, added to the fact that most of the varieties grown there are lacking in quality and are used for animal feed [11].

4. Conclusions

The date industry is important in Tunisia, in terms of production and export, playing a key socio-economic role. Given the analysis of this sector's competitiveness within the Mediterranean basin and Iran, we conclude that Tunisia has a highly important trade position compared to the Mediterranean area. Nonetheless, recent years have seen a decline in this comparative advantage due to declining competitiveness indices.

5. Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Erasmus Mundus program, for their support and scholarship, without which the present work could not have been completed.

6. References

[1] AFDB. 2012. Distortions to agricultural policy incentives in Tunisia: A preliminary analysis.

African Development Bank, Economic Brief. Available

in: <http://www.afdb.org/fileadmin/uploads/afdb/Documents/Publications/Brochure%20note%20Opolitique%20agriculture%20Anglais.pdf>.

[February 2014].

[2] Omoregie E.M., Thomson K.J., 2001. Measuring regional competitiveness in oilseeds production and processing in Nigeria: a spatial equilibrium modelling approach. *Agr. Econ.* 26: 281-294.

[3] Siddiq M., Aleid S.M., Kader A.A. 2013. Dates: postharvest sciences, processing technology and health benefits. Ed: Wiley-Blackwell. Pág. 326.

[4] APIA. 2008. Étude de positionnement stratégique de la Deglet Nour tunisienne et de la promotion de ses exportations a long et moyen terme. Ed: Agence de Promotion des Investissements Agricoles de la Tunisie, Tunisie. Pág. 194.

[5] Asche F., Guttormsen A.G., Sebulonsen T., Sissener E.H. 2005. Competition between farmed and wild salmon: The Japanese salmon market. *Agr. Econ.* 33: 333-340.

[6] Martínez-Sánchez A. 1994. Competitividad internacional en el sector de telecomunicaciones. *Cuadernos de Ciencias Económicas y Empresariales* 27:129-137.

[7] Ahmadi-Esfahani F.Z. 2006. Constant market shares analysis: uses, limitations and prospects. *Aust J. Agr. Resour. Econ.* 50: 510-526.

[8] Rached Z., Ali-Salmi A., Khaldi R. 2012. Les performances techniques des dattes biologiques et conventionnelles en Tunisie: Cas de la région de Hezoua. *New Medit.* 13: 50-58.

[9] Vollrath T.L. 1991. A theoretical evaluation of alternative trade intensity measures of revealed competitive advantage. *Weltwirtsch Arch* 130: 265-279.

[10] Dawson P.J. 2005. Agricultural exports and economic growth in less developed countries. *Agr. Econ.* 33: 145-152.

[11] Soliman S.S., Ahmed-Ali B., Mohamed-Ahmed M.M. 2003. Genetic comparisons of Egyptian date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) by RAPD-PCR. *Afr. J. Biotechnol.* 2(4): 86-87.

Tables y Figures

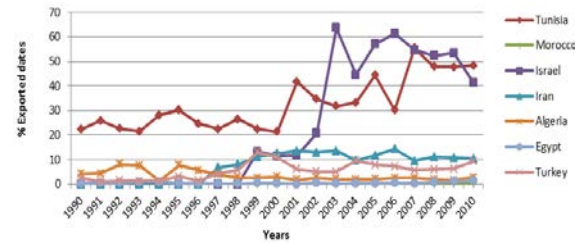


Figure 1. Percentage of exported dates according to countries.

Table 1. Analysis of no-price competitiveness of dates in the Mediterranean and Iran

a) Specialization index (RCA or BIS)					
Country	1991-95	1996-00	2001-05	2006-10	Averages
Tunisia	6194	7345	6694	5391	6406
Iran	2742	2188	1429	1260	1905
Israel	633	305	1127	1053	779
France	30	37	26	18	28
Egypt	207	170	78	173	157
Algeria	30213	35331	13713	6720	21494
Italy	2	3	2	5	3
Jordan	139	60	137	149	121
Turkey	2	7	8	9	6
Morocco	45	5	7	1	14
Spain	3	3	2	2	3
Mediterranean	100	100	100	100	100

b) Dependency ratio (DR)					
Country	1991-95	1996-00	2001-05	2006-10	Averages
Tunisia	10,7	17,5	26,2	15,2	17,4
Iran	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1
Israel	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1
France	201,1	189,0	125,1	105,5	155,2
Egypt	28,7	7,5	5,5	14,5	14,1
Algeria	2,2	0,2	0,4	0,0	0,7
Italy	76,3	72,0	46,7	42,9	59,4
Jordan	506,7	379,3	343,7	305,0	383,7
Turkey	26,7	38,5	54,9	77,4	49,4
Morocco	158,2	373,3	1877,6	1921,2	1082,6
Spain	79,7	99,4	66,5	58,0	75,9
Mediterranean	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

c) Constant market share (CMS)					
Country	1991-95	1996-00	2001-05	2006-10	Averages
Tunisia	36,6	40,1	43,4	44,0	41,0
Iran	32,6	27,0	21,2	25,6	26,6
Israel	10,3	4,3	13,4	13,1	10,3
France	14,5	16,3	10,7	6,7	12,0
Egypt	1,3	1,1	0,8	2,6	1,4
Algeria	30,7	22,8	8,3	4,8	16,6
Italy	0,3	0,5	0,5	1,1	0,6
Jordan	0,4	0,2	0,7	0,9	0,5
Turkey	0,1	0,4	0,4	0,5	0,3
Morocco	0,4	0,0	0,1	0,0	0,1
Spain	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5
Mediterranean	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

d) Trade balance index (TBI)					
Country	1991-95	1996-00	2001-05	2006-10	Averages
Tunisia	99,8	99,5	99,2	99,6	99,5
Iran	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Israel	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0
France	-35,1	-36,5	-39,6	-40,1	-37,8
Egypt	46,6	68,9	71,8	74,3	65,4
Algeria	99,8	100,0	99,8	100,0	99,9
Italy	-95,0	-91,7	-89,1	-68,1	-86,0
Jordan	-72,8	-82,4	-58,5	-43,0	-64,2
Turkey	-61,2	-47,1	-54,8	-61,0	-56,0
Morocco	-50,9	-97,9	-99,5	-99,9	-87,1
Spain	-83,9	-89,3	-89,0	-83,8	-86,5
Mediterranean	32,3	19,2	15,9	25,3	23,2



POSTER SESSION I
Food Technology and
Engineering

Effects of heat treatments in combination with high hydrostatic pressures (HHP) on the viability and physiological state of *Clostridium* species

I. Gómez-Jódar, A. Palop

Dpto. Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, España. igj1@alu.upct.es

Resumen

Clostridium es un microorganismo esporulado anaerobio cuyas esporas presentan un amplio rango de valores D_{100} de 16 a 124 minutos dependiendo de la cepa y otros factores. Tratamientos térmicos más severos serían necesarios para inactivar las esporas bacterianas en la industria alimentaria pero estos podrían afectar la calidad de los alimentos. Por ello, la industria alimentaria está buscando tecnologías alternativas. Las altas presiones hidrostáticas en combinación con calor es una interesante alternativa que muestra un efecto sinérgico que mejora la inactivación de los microorganismos. Después del tratamiento, algunos microorganismos dañados pueden permanecer en el producto. Se ha mostrado que los microorganismos dañados de algunas especies pueden adaptarse a diferentes tipos de estrés y desarrollar resistencias cruzadas comprometiendo la calidad y seguridad alimentaria. Por tanto, es necesario optimizar las tecnologías alternativas y asegurar que éstas causan el mínimo daño subletal.

Palabras clave: conservación de alimentos; tecnologías no térmicas; microorganismos esporulados; daño subletal; adaptación al estrés

Abstract

Clostridium is an anaerobic spore-forming microorganism whose spores show a wide range of D_{100} values from 16 to 124 minutes depending on the strain and other factors. More severe heat treatments would be necessary to inactivate the bacterial spores in the food industry but these could affect the food quality. The food industry is looking for alternative technologies and it is reported that the high hydrostatic pressures in combination with heat show a synergistic effect which improves the inactivation of microorganisms. After the treatment some damaged microorganisms could remain in the product. It is reported that damaged microorganisms of some species adapt themselves to several stressful conditions and develop cross-resistances compromising the food quality. Thus, it is necessary to optimize the alternative methods and ensure they cause the minimum sublethal damage.

Keywords: food preservation; alternative technologies; spore-forming microorganisms; sublethal damage; stress adaptation

1. Introduction

Clostridium is one of the most frequent heat-resistant spore-forming pathogen [1; 2].

Currently, heat treatments are still the most used methods to preserve food. However, due to the high heat resistance of some bacterial spores, more severe heat treatments would be necessary [3; 4]. This might decrease the food quality.

The high hydrostatic pressures have emerged as a powerful alternative to the heat treatments. However, the optimization of this emergent technology is required. For this purpose, suitable scientific data are necessary.

The aim of this bibliographic research is to obtain an overview of the combined use of the preservation technologies for microbial inactivation as well as of the effect of such technologies on the microbial population in order

to validate and optimize the high hydrostatic pressures combined with heat for food preservation.

2. Materials and Methods

Published papers in SCI journals related to this subject were used to carry out this bibliographic research. Scientific databases such as Scimedirect and Scopus were the searching tools to obtain such information. Reports from the food safety authorities were also used.

3. Results

Generally, the conventional heat treatments are well established and traditionally applied to pasteurize and sterilize food. However, in recent years, occurrence of more heat resistant spores often evoked even more severe heat treatments [3; 4].

Clostridium is an anaerobic, Gram-positive, spore-forming microorganism and it is considered as one of the most frequent spore-forming pathogen [1]. In fact, bacterial toxins produced by *Clostridium* were one of the most frequently identified agents in the UE causing 12 deaths [2]. *Clostridium perfringens* is the third most common cause of bacterial disease foodborne in the United States causing around 250,000 cases each year [5]. Some authors have reported that the spores of *Clostridium perfringens* are able to survive 15-22 minutes at 100°C in meat gravy [6] while others reported that *Clostridium perfringens* survives 1 hour at 100°C [7] and shows a wide range of D_{100} values from 16 to 124 minutes depending on the strain [8; 9]. It has also been reported that depending on the enterotoxin gene location of *Clostridium perfringens*, this microorganism shows a higher or a lesser heat resistance [8]. Thus, the current heat resistance data of *Clostridium perfringens* spores are very different. However, there are no data in the literature about the heat resistance of *Clostridium perfringens* spores and the behaviour of this microorganism under non-isothermal conditions. On the other hand, *Clostridium difficile* is also a spore-forming microorganism which produces severe enteric diseases in humans worldwide [10]. There is no much data in the literature about the heat resistance of its spores, as this microorganism was not frequently related to food. Yet, its presence in animal food is increasingly documented since 2006 [11; 12; 13; 14; 15] and it has been shown that it survives the minimum cook temperature recommended for cooking meat [16] and at least 15 minutes are required to inactivate it at 100°C [17].

More severe heat treatments, aimed at inactivating heat-resistant spore-forming microorganisms, could damage the organoleptic and nutritional quality of food. In addition, the current trend of consumers is to demand less processed and more natural products. In order to satisfy this, the food industry is looking for alternative technologies [18]. These alternative technologies would produce a series of log reductions of the initial load that are recognized as safe [19], which means that an important number of damaged microorganisms would remain in the product [20;21]. As the presence of these microorganisms might be dangerous for consumers, the preservation by mild treatments or alternative technologies must be properly validated. Thus, suitable scientific data are necessary to optimize and validate the alternative technologies.

The high hydrostatic pressures have emerged as a powerful alternative to the heat treatments and in combination with heat show a synergistic effect which improves the inactivation of microorganisms. It might be an effective method for spore inactivation [22; 17]. A study showed that *Clostridium sporogenes* spores are resistant to 1500 MPa at room temperature; yet, the addition of a mild heat treatment (60°C) during the process of high pressures resulted in spore counts 5 log units lower in phosphate buffer, meat and in carrot juice [23].

It is relatively important to know the damage the microorganisms suffer during a technologic treatment and their ability to recover in suboptimal conditions [24;25;26] Some damaged microorganisms could remain in a product after the processing by any preservation technology [20;21] and they might be able to adapt themselves to several stressful conditions [27; 28]. When this happens, the food safety is compromised, being this a real challenge for the food industry [29]. Thus, an important issue in food safety is to check that the alternative methods of preservation inactivate specific microorganisms causing the minimum sublethal damage and avoiding or minimizing the stress adaptation [20;21] In previous projects of our group, damaged cells of *L. monocytogenes*, *Cronobacter sazakazakii*, *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 has been detected after treatments by alternative technologies or mild heat treatments combined or not with natural antimicrobials [30; 31; 32]. It has also been reported that high heating rates are more lethal for the vegetative cells of *E. coli* than slow heating rates [33], although the influence of the heating rate on bacterial spores is not very clear [31; 34]. There are several methods available to assess the extension and nature of the sublethal damage within a microbial population such as cultivation in selective agars, cell staining using epifluorescence techniques and flow cytometry [35; 36; 37]. It is also important to take into account the capability of the microorganisms for recovery in fluctuating conditions of parameters such as temperature, pH or activity water (real circumstances in food). Recently, it has been reported the influence of these fluctuations in parameters such as storage temperature, pH or activity water on the capability for recovery and microbial proliferation [38; 39].

4. Conclusions

Research on the behaviour of the microbial population which survives both conventional heat treatments and alternative technologies (high hydrostatic pressures combined with heat) is necessary. This data will allow optimizing the preservation technique by high hydrostatic pressures in such way that it will produce the maximum death to the microorganism, minimizing the existence of sublethal damage.

5. Acknowledgments

The financial support of this research will be provided by the Ministry of Economy and Competitiveness of the Spanish Government through Project AGL2013-48993-C2-1-R.

6. References

- [1] Brown K.L., 2000. Control of bacterial spores. *Brit Med Bull* 56, 158 – 171.
- [2] ECDC. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2012. ECDC report to EFSA, Parma, 2013
- [3] Oomes S., van Zuijlen A., Hehenkamp J., Brul S., 2007. The characterization of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *Int J Food Microbiol* 120, 85 – 94.
- [4] van Zuijlen A., Periago M.P., Amézquita A., Palop A., Brul S., Fernández S.P., 2010. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilisation. *Food Res Int* 43, 1895 – 1901.
- [5] Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCraig L.F., Brese J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607 – 625.
- [6] Juneja V.K., Novak J.S., Huang L., Eblen B.S., 2003. Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. *Food Control* 14, 163 – 168.
- [7] Labbe R.G., 2000. *Clostridium perfringens*. In: Downs, F.P., Ito, K. (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association, 325 – 330.
- [8] Sarker M.R., Shivers R.P., Sparks S.G., Juneja V.K., McClane B.A., 2000. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl Environ Microb* 66, 3234 – 3240.
- [9] Novak J.S., Juneja V.K., McClane B.A., 2003. An ultrastructural comparison of spores from various strains of *Clostridium perfringens* and correlations with heat resistance parameters. *Int J Food Microbiol* 86, 239 – 247.
- [10] McFarland L.V., 2008. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract* 5, 40 – 48.
- [11] Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Duffield T., Peregrine A.S., Trotz-Williams L.A., Arroyo L.G., Brazier J.S., Weese J.S., 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect Dis* 12, 1730 – 1736.
- [12] Keel K., Brazier J.S., Post K.W., Weese J.S., Songer J.G., 2007. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol* 45, 1963 – 1964.
- [13] Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Duffield T., Weese J.S., 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 13, 485 – 487.
- [14] Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Weese J.S., 2009. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerg Infect Dis*, 831 – 834.
- [15] Songer J.G., Trinh H.T., Killgore G.E., Thompson A.D., McDonald L.C., Limbago B.M., 2009. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA. *Emerg Infect Dis* 15, 819 – 821.
- [16] Rodriguez-Palacios A., Reid-Smith R.J., Stämpfli H.R., Weese J.S., 2010. *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe* 16, 540 – 542.
- [17] Hofstetter S., Gebhardt D., Ho L., Gänzle M., McMullen L.M., 2013. Effects of nisin and reutericyclin on resistance of endospores of *Clostridium* spp. to heat and high pressure. *Food Microbiol* 34, 46 – 51.
- [18] Ahvenainen R., 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends Food Sci Tech* 7, 179.
- [19] NACMCF. 2006. Requisite Scientific Parameters for Establishing the Equivalence of Alternative Methods of Pasteurization. *J Food Protect* 69, 1190.
- [20] García, D., Gomez, N., Condon, S., Raso, J., Pagan, R., 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *E. coli*. *Letters of Applied Microbiology* 36, 140.

- [21] García D., Gómez N., Mañas P., Condon S., Raso J., Pagan R., 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal Appl Microbiol* 99, 94.
- [22] Seyderhelm T., Knorr D., 1992. Reduction of *Bacillus stearothermophilus* spores by combined high pressures and temperature treatments. *ZFL European Food Science* 43, 17 – 20.
- [23] Maggi A., Gola S., Rovere P., Miglioli L., Dall'Aglio G., Lonneborg N.G., 1996. Effect of combined high pressure-temperature treatments on *Clostridium sporogenes* spores in liquid media. *Ind Conserve* 71, 8 – 14.
- [24] Bower C.K., Daschel M.A., 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int J Food Microbiol* 50, 33 – 44.
- [25] Yura T., Kanemori M., Morita M.Y., 2000. The heat-shock response: regulation and function, pp 3 – 18. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (Eds.), *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington DC.
- [26] Periago P.M., Abee T., Wouters J.A., 2002a. Analysis of the heat-adaptative response of psychrotrophic *Bacillus weihenstephanensis*. *Int J Food Microbiol* 79, 17 – 26.
- [27] Periago PM, van Schaik W, Abee T and Wouters JA, 2002. Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microb* 68, 3486–3495.
- [28] Isohanni P., Huehn S., Aho T., Alter T., Lyhs U., 2013. Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiol*, In press.
- [29] Lou Y., Yousef A.E., 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microb* 63, 1252.
- [30] Esteban M.D., Palop A., 2011. Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of *Listeria monocytogenes* heat-treated cells. *Food Technol Biotech* 49, 89.
- [31] Esteban M.D., Aznar A., Fernández P.S., Palop A., 2013. Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*. *Food Sci Technol Int* 19, 357.
- [32] Huertas J.-P., Álvarez-Ordóñez A., Morrissey R., Ros-Chumillas M., Esteban M-D., Maté J., Palop A., Hill C., 2015. Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behaviour in reconstituted powdered infant formula. *Food Res Int* 69, 401 – 409.
- [33] Conesa R., Andreu S., Fernández P.S., Esnoz A., Palop A., 2009. Non-isothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal Appl Microbiol* 107, 506.
- [34] Gómez-Jódar I., Ros-Chumillas M., Palop A., 2015. Effect of heating rate on highly heat resistant spore-forming microorganisms. *Food Sci Technol Int*. DOI: 10.1177/1082013215580494
- [35] Smelt J.P.P.M., Otten G.D., Bos A.P., 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol* 73, 207 – 212.
- [36] Muñoz M., Guevara L., Palop A., Tabera J., Fernandez P.S., 2009. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *Food Sci Tech* 42, 220 – 227.
- [37] Antolinos V., Esteban M.D., Ros-Chumillas M., Huertas J.P., Periago P.M., Palop A., Fernández P.S., 2014. Assessment of the acid shock effect on viability of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* using flow cytometry. *Food Res Int* 66, 306 – 312.
- [38] Muñoz M., Fernández P.S., George S., Pin C., 2010. Modeling the Lag Period and exponential growth of *L. monocytogenes* under conditions of fluctuating temperature and water activity values. *Appl Environ Microb* 76, 2908.
- [39] Antolinos V., Muñoz M., Ros M., Periago P.M., Fernández P.S., Le Marc Y., 2012. Modelling the effects of temperature and osmotic shifts on the growth kinetics of *B. weihenstephanensis* in broth and food products. *Int J Food Microbiol* 158, 36.

Association among aroma volatiles and other traits in near-isogenic lines with firm flesh texture

M. Zarid, J.P. Fernández-Trujillo

Department of Agricultural and Food Engineering, Technical University of Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48. ETSIA & Institute of Plant Biotechnology. E-30203 Cartagena (Murcia), Spain. m.zarid@gmail.com

Resumen

La calidad en los melones (*Cucumis melo* L.) es un criterio importante para la aceptación del consumidor. Al igual que en cualquier otra fruta, el proceso de desarrollo y maduración involucra una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos como la descomposición de la clorofila, la degradación de la pared celular (que resulta desde ablandamiento a cambios en la ultraestructura de la pulpa y del fruto entero), el aumento en el contenido de azúcares y el contenido de sólidos solubles (SSC), la biosíntesis de pigmentos, aromas y la generación de sabor, etc. El objetivo de la tesis doctoral será determinar la calidad global y perfil aromático de al menos una línea casi isogénica (NIL) de melón con diferencias en textura respecto a su parental no climatérico (PS) para mapear QTLs asociados a la calidad especialmente aromática y textural de la fruta. Utilizando resultados de expresión génica diferencial PS-NIL y el mapa genético de melón y las secuencias previamente almacenada en el GenBank estaremos posicionando genes candidatos y relacionando esta información con el fenotipo.

Palabras clave: Textura, líneas casi isogénicas; comportamiento no climatérico; Mapeo de QTLs; RNA-seq.

Abstract

Quality in melons (*Cucumis melo* L.) is an important criterion for consumer's acceptance. Like any other fruit, melons development and ripening process are linked to a series of biochemical and physiological changes including chlorophyll breakdown, cell wall degradation (leading from flesh to whole fruit softening to changes in ultrastructure), increase in the sugar content and soluble solids content (SSC), pigment biosynthesis, aroma and flavour generation, etc. The goal of the PhD will be to determine global quality and aroma profile at least one near-isogenic lines (NILs) of melon with different texture than its non-climacteric parental PS in order to map QTLs associated with fruit quality and particularly aroma volatiles. Using some results of differential gene expression and the genetic map of melon and the sequences stored in GenBank some candidate genes will be suggested and linking genetic and phenotypic information.

Keywords: Texture, near-isogenic lines; non-climacteric behavior; QTL mapping; RNA-seq.

1. Introduction

The present research will elucidate the quality of melons in their postharvest supply chain as part of our breeding strategies to improve the crop overall quality. This research particularly will gain knowledge based on near-isogenic lines (NILs) of melons and the genetic map of melon [1], a model system where many quantitative trait loci have been identified useful for postharvest purposes, with emphasis on multidisciplinary studies involving quality traits, physiological and biochemical studies, and modelling. The parentals used to generate melon NILs were the cv. T111 of the inodorous group and “*Piel de sapo*” type, and the Korean

accession “*Shongwhan Charmi*” (SC) PI 161375 [1]. NILs are almost genetically identical lines differing in small genetic component from its donor parent. This unique feature allows a quick mapping of quantitative trait loci (QTLs) associated with the traits of interest [1], a possibility that is complementing and provides added value to typical postharvest and fruit quality studies [2]. In fact more than 250 QTLs associated with melon fruit quality traits have been mapped so far by the phenotyping work of the UPCT group using the NILs [3, 4] and in other groups [5]. Of particular, our interest are the NILs involved in climacteric behaviour and aroma production, because parental lines of this population showed non-climacteric behaviour

and were non-aromatic in flavour [6]. Other QTLs of interest are fruit weight and shape, texture, colour, fruit composition and nutritional traits, sensitivity to storage disorders and decay, etc. have been previously identified [4] but the knowledge hasn't been explored further using multidisciplinary approaches to study the postharvest quality in melons.

Melon aroma precursors are fatty acids such as the insaturated ones (linolenic, linoleic or oleic acids), and amino acids such as phenylalanine, leucine, isoleucine, valine or methionine. The application of these aminoacids to melon stimulate melon aroma and the catabolism of some of them produce aroma such as methionine [7]. The QTLs associated with aromas derived from aminoacid catabolism are still of interest in melons because only a few of them have been mapped [8]. These QTLs can be transferred to elite cultivars and improve fruit aroma quality and organoleptic properties [9].

2. Materials and methods

The following work actions are proposed to meet the above objectives. Some NILs of melon (NILs) from the collection of Eduardo et al. (2005) [1] and others with fewer introgressions of PI 161375 into the PS genetic background will be used for the studies proposed below such as SC7-2 and SC10-2 [1,10,8].

The methodologies of experimental design, melon crop management, fruit sampling and fruit quality evaluation (including aroma) using univariate and multivariate statistical methodology to discriminate NILs and to map QTLs have been previously published [3,4]. The thesis will be realized following these steps:

- 1) Sampling and aroma volatile analysis (HS-SPME coupled to RTL GC-MS) [10,4].
- 2) Data analysis and integration, validation, etc. [8].
- 3) Characterizing aroma profile in detail of the NIL SC7-2.
- 4) Identification of some key aroma volatiles of the NIL SC10-2 versus PS.
- 5) RNA extraction: TRI Reagent RNA isolation protocol.
- 6) mRNA library preparation and sequencing: TruSeq™ Stranded mRNA Sample Preparation kit protocol (Illumina Inc., Redwood. CA, USA).
- 7) Transcripomic analysis.
- 8) Univariate and multivariate statistical analysis (PS vs NIL).
- 9) QTL mapping and candidate genes location.
- 10) Association of aroma volatile with other textural traits.
- 11) Association of aroma volatile with the expression of some genes of interest in SC10-2.
- 12) Thesis document and presentation.

3. Acknowledgements

Financial support was provided by Fundación Séneca de la Región de Murcia (11784/PI/09), MINECO & UE-FEDER funds (AGL2010-20858). M.Z is supported by the UE-Mundus program. We acknowledge the assistance of P. Varó & his team in CIFEATorre Pacheco (Consejería de Agricultura, Región de Murcia) for crop management, and to M.J. Roca (SAIT-UPCT) & N. Dos-Santos for technical assistance.

4. References

- [1] Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A.J. 2005. Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theor. Appl. Genet.* 112:139-148.
- [2] Fernández-Trujillo, J.P., Obando-Ulloa, J.M., Martínez, J.A., Moreno, E., García-Mas, J., Monforte, A.J. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit 2. Linking climacteric pattern and main postharvest disorders and decay in a set of near-isogenic lines. *Postharvest Biol. Technol.* 50: 125-134.
- [3] Obando, J., Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J.A., Alarcón, A.L., Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A.J. 2008. Identification of melon fruit quality quantitative trait loci using near-isogenic lines. *J Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 139-151.
- [4] Obando-Ulloa, J.M., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 27-37.
- [5] Diaz A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J.E., Zalapa, J.E., Cuevas, H.E., Dace, G., Oliver, M., Boissot, N., Dogimont, C., Pitrat, M., Hofstede, R., Koert, P., Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Cohen, S., Schaffer A, Katzir, N., Xu, Y., Zhang, H., Fukino,

- N., Matsumoto S, Garcia-Mas J., Monforte, A.J. 2011. A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). BMC Plant Biol. 11:111.
- [6] Périn, C., Gómez-Jiménez, M., Hagen, L., Dogimont, C., Pech, J. C., Latché, A., Pitrat, M., Lelievre, J.M. 2002. Molecular and genetic characterization of a nonclimacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. Plant Physiol. 129: 300-309.
- [7] Gonda, I., Bar, E., Sikron, N., Portnoy, V., Tadmor, Y., Schaffer, A.A., Katzir, N., Burger, Y., Fait, A., Lewinsohn, E. 2012. L-methionine catabolism into sulfur aroma volatiles in melon fruit. Pharm. Biol. 50: 621-622.
- [8] Dos-Santos, N., Bueso, M., Fernández-Trujillo, J.P. 2013. Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. Food Res. Int. 54:1801-1812.
- [9] Chaib, J., Lecomte, L., Buret, M., Causse, M. 2006. Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (QTLs) for organoleptic quality in tomato. Theor Appl. Genet. 112: 934-944.
- [10] Moreno, E., Obando, J., Dos-Santos, N., Fernández-Trujillo, J.P., Monforte, A.J., García-Mas, J. 2008. Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. Theor. Appl. Genet. 116: 589-602.
- [11] Amaro A. L., Fundo J. F., Oliveira A., Beaulieu J. C., Fernández-Trujillo J.P., Almeida D. P. F. 2013. 1-methylcyclopropene effects on temporal changes of aroma volatiles and phytochemicals of fresh-cut cantaloupe. J. Sci. Food Agric. 93:828–837.
- [12] Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A.A., Tadmor, Y., Gepstein, S., Giovannoni, J.J., Katzir, N., Lewinsohn, E. 2010. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. J. Expt. Bot. 61: 1111-1123.
- [13] Nuñez-Palenius, H.G., Gomez-Lim, M., Ochoa-Alejo, N., Grumet, R., Lester, G., Cantliffe, D.J. 2008. Melon fruits: Genetic diversity, physiology and biotechnology features. Crit. Rev. Biotechnol. 19: 13-55.
- [14] Seymour, G.B., McGlasson, W.B. 1993. Melons. En: Tucker, G.A., E.A. Baldwin, C.J. Brady, D. Grierson (Eds.). Biochemistry of fruit ripening. Chapman and Hall, London, pp. 269-290.

Development of innovative food with high nutritional value from native legumes

E. Collado⁽¹⁾, E. Armero ⁽²⁾, P. Gómez ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto de Biotecnología vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar. Edificio I+D+I. 30202. Cartagena (Murcia), España. ecm3@alu.upct.es

⁽²⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Grupo de Producción Animal. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena (Murcia), España.

Resumen

Las leguminosas contienen una alta concentración de proteínas, una proporción adecuada de hidratos de carbono y un contenido bajo en grasas. Además, son ricas en vitaminas del grupo B, antioxidantes y fibra. Esto las convierte en un alimento valioso en la lucha contra la obesidad y en la prevención y control de enfermedades crónicas tales como la diabetes, la hipercolesterolemia, diferentes cardiopatías y el cáncer. Actualmente, la leguminosa con más presencia en la alimentación humana y animal en Europa es la soja, la cual es mayormente importada. El objetivo de esta Tesis es fomentar el consumo de legumbres de producción autóctona que puedan contribuir a un reemplazo progresivo de la soja mediante el desarrollo de nuevos alimentos de alto valor nutritivo, tanto frescos como procesados, de haba (*Vicia faba*), guisante (*Pisum sativum*) y caupí (*Vigna unguiculata*). Asimismo, puesto que estas especies se están utilizando para la alimentación de ganado caprino, se analizará el efecto que tienen sobre la producción y calidad de la leche.

Palabras clave: guisante; haba; caupí; proteína; nutrición

Abstract

Legumes contain a high concentration of protein, an appropriate proportion of carbohydrates and they are low in fats and rich in vitamin B, antioxidants and fiber. This makes them a valuable food in the fight against obesity and in the prevention and control of chronic diseases such as diabetes, hypercholesterolemia, heart disease and various types of cancers. Currently, the legume with more presence in food and feed in Europe is soybean, which is mostly imported. The objective of this Thesis is to promote the consumption of native legumes that can contribute to a gradual replacement of soybean by developing new highly valuable minimally fresh processed and thermally processed food based on faba bean (*Vicia faba*), pea (*Pisum sativum*) and cowpea (*Vigna unguiculata*). Also, since these species are being used for feeding goats, the effect on the nutritional value of milk will be analyzed

Keywords: faba vean; pea; cowpea; protein; nutrition

1. Introducción y antecedentes

Las legumbres han sido cultivadas desde hace siglos por una gran variedad de culturas y, según la especie, hay diversos orígenes. Sí parece seguro que, junto a los cereales, constituyen uno de los alimentos básicos de la población desde el Neolítico, cuando el hombre comenzó a cultivar la tierra y practicar la agricultura de forma complementaria a su actividad primitiva de la caza [1]

En la alimentación humana y animal se utilizan hasta 150 especies de leguminosas, de las que las más relevantes para el consumo humano son soja, judías, lentejas, guisantes, garbanzos, habas y caupís. En su composición destacan su alto contenido de proteínas, la presencia de hidratos de carbono de asimilación lenta, minerales (calcio, hierro, zinc), fibra (soluble) y algunos

componentes bioactivos. Así, está demostrado que su consumo ayuda en la prevención y control de enfermedades crónicas tales como la diabetes, la hipercolesterolemia, diferentes cardiopatías y el cáncer [2]

La soja es la principal leguminosa cultivada en el mundo, con un 56% de la producción total, siendo EEUU, Brasil y Argentina los principales productores y exportadores. La producción de soja en la UE es prácticamente nula, lo que supone una importante dependencia de esta especie vegetal. Por lo tanto, fomentar la producción de leguminosas proteaginosas sería una opción interesante para productores y consumidores.

El consumo humano de legumbres es menor en Europa que en otras regiones del mundo y muestra una amplia variabilidad. La posibilidad

de utilizar legumbres frescas, peladas y listas para su uso como un alimento de IV gama, así como la preparación de alimentos pre-cocinados, facilitaría el aumento de su consumo en el hogar, adaptándose a los cambios sociales, económicos y culturales que se orientan hacia una alimentación más sana. Por otra parte, su utilización en la preparación de piensos para el ganado caprino en reemplazo de otras fuentes de proteína, puede tener influencia en la cantidad y calidad nutricional de la leche obtenida.

2. Objetivos

En este trabajo de investigación se pretende poner en valor las especies leguminosas autóctonas, con alto contenido de proteínas y un contenido equilibrado de aminoácidos, con el fin de fomentar su consumo. Para ello, se desarrollarán nuevas formas de presentación de haba, guisante y caupí, tanto mínimamente procesado en fresco listo para consumir (IV gama) como elaborados bajo la forma de purés o patés.

Se pondrá especial énfasis en la calidad nutricional y sensorial, la presencia de compuestos bioactivos, la reducción en la concentración de factores antinutricionales y la seguridad microbiológica.

Por otro lado, debido al hecho de que en determinados casos la soja puede ser sustituida por algunas de las especies de interés en este proyecto para el consumo animal (cabras), se prevé estudiar el efecto que esta sustitución tiene en la cantidad y calidad de la leche.

3. Materiales y Métodos

3.1 Material vegetal

El material vegetal será recolectado del campo de cultivo. Se utilizarán cultivares adaptados a la zona. A su llegada al laboratorio se mantendrán en oscuridad a 1°C hasta el día siguiente, momento en el cual se realizarán los experimentos.

Al día siguiente, el material vegetal será pelado y sumergido en agua fría hasta su exposición a diferentes tratamientos. En el caso del producto en fresco, se evaluarán métodos para evitar el pardeamiento, así como alternativas ecosostenibles de desinfección. En el caso del producto preparado como paté o puré, se analizarán diferentes tipos de tratamiento térmico (pasteurización, hervido, etc.),

incluyendo también el uso de un microondas semi-industrial de tipo continuo. En todos los casos se analizarán diferentes tiempos de exposición, temperaturas y potencias para seleccionar aquellos parámetros que mejor preserven el valor nutricional del alimento.

3.1.1 Envasado

El material vegetal fresco será empaquetado en bolsas de plástico de diferentes materiales, con el fin de alcanzar una atmósfera de equilibrio óptima para cada producto. Se almacenará a diferentes temperaturas (1 y 4°C), utilizando en todos los casos al menos 5 repeticiones por tratamiento y día de análisis. Las muestras serán tomadas a diferentes intervalos para realizar distintas determinaciones. Para comprobar que se alcance la atmósfera modificada buscada, se medirán las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono en el interior de los envases. En el caso de los alimentos preparados como patés o purés, se desarrollará el envase que mejor preserve su calidad durante la vida útil y que, al mismo tiempo, sea atractivo para el consumidor.

3.1.2 Análisis a realizar

3.1.2.1 Tasa respiratoria y emisión de etileno

Para el producto en fresco, la tasa respiratoria y la emisión de etileno se determinarán empleando un sistema cerrado. Se realizarán 3 repeticiones con aproximadamente 100 g de material vegetal en botes de cristal herméticamente cerrados, mantenidos a las dos temperaturas (1 y 4°C). La variación de la tasa respiratoria y de etileno se medirá diariamente y durante la vida comercial del producto.

3.1.2.2 Análisis durante la vida útil del producto

Se realizarán las siguientes determinaciones:

-Recuentos microbiológicos: psicrófilos, mesófilos, enterobacterias, mohos y levaduras por métodos estándar de enumeración.

-Análisis de parámetros físico-químicos: pH, sólidos solubles totales, acidez titulable, color, calibre, firmeza al corte.

-Evaluación sensorial: se tendrán en cuenta principalmente la apariencia, sabor, aroma, textura, color, pardeamiento y evaluación global, siendo la calidad sensorial un factor determinante en la vida útil del alimento. Los análisis se realizarán en una Sala de catas estandarizada.

- Análisis de las presiones parciales de O₂, CO₂ y etileno en el interior de los envases de atmósfera modificada mediante un analizador.

3.1.2.3 Análisis posteriores

El material proveniente de cada uno de los experimentos se almacenará a -80°C. Posteriormente, las muestras serán molidas o bien liofilizadas (dependiendo de la determinación que se vaya a realizar), efectuándose los siguientes análisis:

- Capacidad antioxidante, mediante análisis espectrofotométrico.
- Vitamina C, mediante análisis por HPLC.
- Aminoácidos, mediante análisis por HPLC.
- Polifenoles totales, mediante análisis espectrofotométrico.
- Factores antinutricionales, mediante análisis por HPLC.
- Materia seca, mediante calcinación en horno mufla.
- Almidón, mediante análisis espectrofotométrico-
- Azúcares, mediante análisis por UHPLC

3.2 Producción y calidad de leche

3.2.1 Selección de los individuos

Se seleccionará un rebaño de 400 cabras en una empresa de la Región, el cual será dividido en 2 grupos, uno control que seguirá la dieta habitual, y otro experimental en el que la fuente proteica será sustituida por las leguminosas de interés.

3.2.2 Análisis

Durante 2 meses y con una periodicidad semanal, se tomarán muestras de leche para el análisis de:

- Proteínas, según ISO R-937
- Porcentaje de grasa, según ISO 1443
- Ácidos grasos, según O'Fallon et al. [5]

4. **Agradecimientos**

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

5. **Referencias bibliográficas**

- [1] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. [Online]. Disponible en <http://alimentacion.es>. [Acceso: 10-Apr- 2015].
- [2] Chuang S.C., Norat T., Murphy N., Olsen A., Tjønneland A. 2012. Fiber intake and total and cause-specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 96(1): 164–174.

[3] Olmedilla B., Farré R. 2010. The role of pulses in the present-day diet. *Actividad Dietética.* 14(2):72-76

[4] Graham P.H., Vance C.P. 2003. Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol.* 3 872-877

[5] O'Fallon J.V., Busboom J.R., Nelson M.L., Gaskins C.T. 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J Anim Sci.* 85(6):1511-21.

Abiotic stress combination to improve healthiness of fresh vegetables smoothies

A.C. Formica, G.B. Martínez-Hernández, F. Artés-Hernández

Postharvest and Refrigeration Group. Department of Food Engineering. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain. Tel: +34-968-325509; Fax: +34-968-325433. acfdo1@alu.upct.es

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

Abstract

Several epidemiological studies have revealed the potential benefits of an appropriate and equilibrated diet rich in fruit and vegetables to prevent several diseases in those people with genetic predisposition. Phytochemicals of vegetables, such as phenolic compounds, carotenoids and vitamins offer health-promoting benefits. Orange vegetables, such as carrots, pumpkin, sweet potatoes, etc., are very popular in the Mediterranean diet. These vegetables are important contributors of antioxidants in the diet as polyphenols, carotenoids and vitamins (A, C, E, etc). Accordingly, these vegetables could be used as a functional food if the content of such phytochemicals is enhanced. Abiotic stresses, such as UV-C, superatmospheric oxygen, wounding, etc., applied during postharvest can be used as a tool to enhance phytochemicals. Hence, these stressed vegetables with high health-promoting properties can be consumed as a functional food, with high added value, or as a natural nutraceutical to be included in other functional foods like beverages like smoothies.

Keywords: functional food; bioactives; plant biofactories; phenolics; carotenoids

1. State of the art

The current worldwide drive for a healthier lifestyle has led to a rising demand for convenient fresh foods, free from additives, with high nutritional value, including antioxidant and free-radical scavenging properties, to be consumed both in food services and at home [1]. Consumer demands in the field of food production have changed considerably in the last decades. Consumers more and more believe that foods contribute directly to their health. Today foods are not intended to only satisfy hunger and to provide necessary nutrients for humans but also to prevent nutrition-related diseases and improve physical and mental well-being of the consumer. In this regard, functional foods play an outstanding role. The increasing demand on such foods can be explained by the increasing cost of healthcare, the steady increase in life expectancy and the need to satisfy population groups with special needs such as elderly and children [2].

Carrot (*Daucus carota* L.) is a popular vegetable among children and adults. The popularity of this vegetable is mainly due to the pleasant flavour, bright orange colour, healthiness and

relative cheapness among other properties. Carrot is the major vegetable source of provitamin A carotenoids (especially β -carotene) in the human diet, which have been reported to be protective against certain types of cancers and to have other health benefits [3].

Pumpkin (*Cucurbita* spp.) is one of the well-known edible plants and has substantial medicinal properties due to the presence of unique natural edible substances. It contains several phyto-constituents belonging to the categories of alkaloids, flavonoids, and palmitic, oleic and linoleic acids. Various important medicinal properties including anti-diabetic, antioxidant, anti-carcinogenic, anti-inflammatory and others have been well documented [4].

Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) could be considered as an excellent novel source of natural health-promoting compounds, such as β -carotene and anthocyanins, for the functional food market. The high concentration of anthocyanin and β -carotene in sweet potato, combined with the high stability of the colour extract make it a promising and healthier

alternative to synthetic colouring agents in food systems [5].

Reactive oxygen species could be important cause active agents of a great number of human diseases. Antioxidant components provide protection against harmful free radicals, which are produced by aerobic metabolism and have been strongly associated with reduced risk of chronic diseases, such as cardiovascular diseases, cancer, diabetes, Alzheimer's disease, cataracts and age-related functional decline, in addition to other health benefits. Diets rich in orange and dark-green have been associated with a reduction in chronic diseases such as cardiovascular diseases, certain cancers and type 2 diabetes. These protective effects are generally credited to the additive and synergistic effect of antioxidants and other nutrients found in these vegetables. The importance of consuming orange and dark-green vegetables is underscored by the Healthy People 2010 guidelines, which include an objective to increase the proportion of individuals aged 2 years and older who eat at least one daily serving. The '5 A Day' is a worldwide campaign (Spain, USA, United Kingdom, Germany, Canada, etc.) to encourage the consumption of at least five portions of fruit and vegetables each day, following a recommendation by the World Health Organization that individuals consume 'a minimum of 400g of fruit and vegetables per day (excluding potatoes and other starchy tubers)' [6]. The US Department of Agriculture also included a specific recommendation for dark-green and orange vegetable intake in the 2005 Dietary Guidelines for Americans. In general, 0.6 to 0.9 servings of dark-green vegetables and 0.4 to 0.6 servings of orange vegetables per week are recommended for adults. Yet, recent research indicates that intakes of dark-green and orange vegetables among Americans do not meet recommendations [7].

Numerous studies have demonstrated that the lung and others types of cancer are inversely related with the consumption of carotenes [8]. Phenolic compounds in fruits and vegetables are of great interest in two respects. First, they contribute to the sensory qualities of fruits and vegetables: colour, astringency, bitterness, and aroma. Second, some phenolics possess pharmacological properties and are used for therapeutic purposes [9]. The accumulation of phenolic compounds represents a major key factor in the inducible defence mechanisms of plants through the phenylpropanoid pathway. The induction of the phenylpropanoid

metabolism could be also achieved experimentally by treatments with elicitors or exposure to specific stress conditions. However, wound signalling in plants is a complex process involving a whole array of molecules with regulatory activity, where the linear signalling pathways can form networks allowing overlapping and interlinking of signals or cross-talk [10].

The fresh-cut produce market has undergone a rapid growth within the food industry, caused by trends in life style, diet, importance for health, and healthy alternative in restaurants. Additionally, there is an increasingly growing market for nutraceuticals and functional foods. Enhancing the health benefit properties of fruits and vegetables will add value and create new opportunities for growers and processors by reaching health-oriented markets. However, minimal processing operations damage fruits and vegetables tissue integrity which triggers deteriorative processes including oxidative browning, tissue softening, water loss and development of undesirable flavours and odours. In addition, removal of the natural protective epidermal barrier and increase of the moisture and dissolved sugars contents on the product surface provide ideal conditions for microbial colonization and proliferation [11,12]. Accordingly, there is a need to provide technologies that can ensure the delivery of high quality products, safe and with high levels of the desired nutraceuticals [1].

The application of postharvest abiotic stresses in fresh fruits and vegetables induces the accumulation of antioxidants. Among different fruits and vegetables, carrots have shown an excellent response to abiotic stresses to increase their health-promoting compounds [13,14,15]. Carrots respond to wounding stress accumulating phenolic compounds such as caffeoylquinic and ferulic acids. These antioxidant compounds are highly absorbed and metabolized in humans [13]. As a postharvest treatment, UV-C irradiation has proven beneficial to reduce respiration rates, to rot development control, and to delay senescence and ripening in different fruit and vegetables. Packaging under high oxygen conditions can be used to decrease microbial growth during shelf life of fresh-cut fruits and vegetables. Furthermore, this technique may keep sensory attributes, reducing enzymatic browning and preventing anaerobic fermentation and moisture and odour losses. The antimicrobial effect of high oxygen atmospheres, contrary to

the high CO₂ levels reached within packages throughout storage, is not well known yet [12,16]. The most important enzymes associated with discoloration and browning are peroxidase and polyphenol oxidase. In addition, surface-tissue lignification of fresh-cut carrots leads to unfavourable colour changes that reduce acceptability. It has been observed that wounding activates the natural tissue defence mechanisms such as increased phenylalanine ammonia lyase activity, the key enzyme of the phenylpropanoid pathway [14].

To increase the intake of fruits and vegetables, as an alternative and/or addition to the consumption of fresh fruits and vegetables, the food industry offers the manufacture of beverages such as juices and smoothies. Smoothies, originally consisting of purely fresh fruits and vegetables, were first introduced in the 1960 in United States and re-emerged in the 2000. Smoothies are blended drinks consisting of a number of ingredients including fruit (or less commonly vegetables), fruit juice, ice, yoghurt and milk. There are three main types of smoothies: fruit only, fruit and dairy, and functional. Smoothies could contribute to the supply of fruits and vegetables, especially to people who cannot consume fresh fruits and vegetables mainly due to market availability and/or convenience. Depending on the manufacture and composition, one smoothie could be enough to replace the nutritional value of at least one portion of fruits or vegetables [17].

The objective of this PhD Thesis will be to develop smoothies of orange vegetables with high content of bioactive compounds. The bioactive content of harvested vegetables will be conducted through abiotic stresses. Accordingly, conditions of abiotic stresses will be optimized in order to obtain the maximum bioactive content enhancements in the vegetables which will be used to obtain functional smoothies. Furthermore, optimum thermal and non-thermal treatments will be studied in order to obtain a product with excellent sensory attributes during its commercial life meeting always the applicable food safety regulations.

2. Acknowledgements

We acknowledge Spanish Ministry of Economy and competitiveness MINECO (AGL2013-48830-C2-1-R) and FEDER for financial support.

References

- [1] Artés F., Gómez P., Aguayo A., Escalona V.H., Artés-Hernández F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 287-296.
- [2] Siró I., Kopolna E., Kopolna B., Outweigh A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite.* 51: 456–467.
- [3] Kjeldsen F., Christensen L.P., Edelenbos M. 2013. Changes in volatile compounds of carrots (*Daucus carota* L.) during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5400–5407.
- [4] Yadav M., Jain S., Tomar R., Prasad G.B.K.S., Yadav H. 2010. Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review. *Nutr. Res. Rev.* 23: 184-190.
- [5] Bovell-Benjamin A.C. 2007. Sweet Potato: A review of its past, present, and future role in human nutrition. *Adv. Food Nutr. Res.* 52: 1–59.
- [6] <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>
- [7] Izumi B.T. *et al.* 2011. Associations between neighborhood availability and individual consumption of dark-green and orange vegetables among ethnically diverse adults in Detroit. *Diet Assoc.* 111: 274-279.
- [8] Ziegler R.G., Colavito E.A., Hartge P., McAdams M.J. 1996. Importance of α -carotene, β -carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J. National Cancer Institute.* 88: 612-615.
- [9] Alasalvar C., Grigor J.M., Zhang D., Quantick P.C., Shahidi S. 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1410-1416.
- [10] Heredia J.B., Cisneros-Zevallos L. 2009. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pal activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 242–249.
- [11] Iqbal T., Rodrigues F., Mahajan P., Kerry J., Gil L., Manso M. 2008. Effect of minimal processing conditions on respiration rate of carrots. *J. Food Sci.* 73: 396-402.
- [12] Alegria C., Pinheiro J., Duthoit., Gonçalves M. 2012. Fresh-cut carrot (cv. Nantes) quality as affected by abiotic stress (heat shock and UV-C irradiation) pre-treatments. *LWT - Food Sci. Technol.* 48: 197-203.

- [13] Jacobo-Velázquez D.A., Martínez-Hernández G.B., Rodríguez S.C, Cao C.M., Cisneros-Zevallos L. 2011. Plants as biofactories: Physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. *J. Agric. Food Chem.* 59: 6583-6593.
- [14] Cisneros-Zevallos L. 2003. The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical Content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 68: 1560-1565.
- [15] Fernando Reyes L., Villarreal J.E., Cisneros-Zevallos L. 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chem.* 101: 1254–1262.
- [16] Martínez-Hernández G.B., Artés-Hernández F., Gómez P.A., Formica A.C, Artés F. 2013. Synergistic combination of electrolyzed water, UV-C and superatmospheric O₂ packaging for improving fresh-cut broccoli quality. *Postharvest Biol. Technol.* 76: 125–134.
- [17] Di Cagno R., Minervini G., Rizzello C.G., De Angelis M., Gobbetti M. 2011. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothie. *Food Microbiol.* 28: 1062-1071.

Changes in the phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* in chilli pepper CM334 resistant to *Phytophthora capsici*

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

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

noessp@yahoo.com(2) Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo km. 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Estado de México CP 56230, México.

(3) Department of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093. Warsaw, Poland.(4) Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5, Carr. México-Texcoco. Montecillo, Edo. De México, C.P. 56230, México

.Resumen

La línea endogámica de chile Criollo de Morelos 334 (CM334) es resistente a *Phytophthora capsici* Leonian, pero *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 podría romper su resistencia en plantas previamente infectadas por el nemátodo. Este fenómeno es conocido como “ruptura de la resistencia”. La resistencia de las plantas de chile CM334 ha sido asociada con la ruta de los fenilpropanoides. Tanto los ácidos fenólicos como los flavonoides son metabolitos sintetizados a través de esa ruta metabólica y juegan importantes funciones en la interacción planta-patógeno. El objetivo de esta tesis doctoral será determinar qué cambios son inducidos por *N. aberrans* en la ruta fenilpropanoide que podrían convertir al tejido resistente en un substrato favorable para el establecimiento de *P. capsici*. Los cambios inducidos por *N. aberrans* en la actividad de la L-fenilalanina amonio liasa, el contenido total de fenoles solubles totales, el establecimiento de un perfil y la caracterización de ácidos fenólicos solubles y flavonoides, el efecto tóxico de los flavonoides de la raíz en nemátodos y el contenido de lignina en plantas de chile CM334 podrían ser asociados a esta ruptura de la resistencia a *P. capsici* en chile CM334.

Palabras clave: Ácidos fenólicos; Defensa vegetal; Flavonoides; Nemátodos agalladores; PAL.

Abstract

The inbred chilli line Criollo de Morelos 334 (CM334) is resistant to *Phytophthora capsici* Leonian, but *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 could break down resistance of plants previously infected by this nematode. This phenomenon is known as “resistance breakdown”. The resistance of CM334 chilli pepper plant has been associated to the phenylpropanoid pathway. Both phenolic acids and flavonoids metabolites are synthesized in this metabolic pathway and play an important role in the plant-pathogen interaction. The goal of this PhD project will be to determine which changes are induced by *N. aberrans* in the phenylpropanoid pathway that could turn the resistant plant tissues into a favourable sub-stratum for the establishment of *P. capsici*. Changes induced by *N. aberrans* on L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, total soluble phenols content, the profiling and characterization of soluble phenolic acids and flavonoids, the toxic effect of root flavonoids on nematodes and the lignin content of CM334 chilli pepper plants may be associated to the breakdown of resistance to *P. capsici* in CM334 chilli pepper.

Keywords: Flavonoids, Phenolic acids, PAL, Plant defences, Root-knot nematodes.

1. Introduction

Crop plants are constantly exposed to innumerable and diverse biotic and abiotic factors. Concerning the first, interactions between plants and soil microorganism are the most dynamic ones [1]. Only a fraction of the whole soil biota is able to establish a pathosistic

relation with one or more crop plants. Most of the root diseases have a complex etiology because they are influenced by associated microorganism [2]; therefore, the root infection by one pathogen may modify the host response to subsequent infections [1]. Interactions which involve phytoparasitic nematodes and soilborne plant pathogens that cause root-rots and wilting might result in additive or synergistic effects on

the development and yield of the host, or in the phenomenon known as “resistance breakdown”; which occurs when a cultivar resistant to a particular soilborne pathogen becomes susceptible after being infected by certain species of phytonematodes [3]. Root-knot nematodes such as *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood and *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 might be involved in the resistance breakdown [4-5]. Using the model *Nacobbus aberrans*-pepper (*Capsicum annuum* L) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leoninan, we will try determining what biochemical changes are induced by the nematode, which in turn could be associated to the breakdown of resistance to *P. capsici* in CM334 chilli plants. Losses in crop yield due to *Nacobbus aberrans* have economic impact in agriculture in temperate and subtropical regions in USA, Mexico, Ecuador, Bolivia, Peru, Chile and Argentina [6].

Phenylpropanoid pathway plays an important role in plant-pathogen interactions [7]. Infection of chilli pepper (*Capsicum annuum*) CM334 by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* induces changes in this metabolic pathway [8]. These changes affect the resistance of CM334 to the oomycete *Phytophthora capsici*. On the other hand, it has been proposed that the resistance both in root and foliage of CM334 is determined by different genes [9]. Therefore, two different mechanisms appear to be conferring resistance in CM 334 chilli pepper plants; one in root and other in foliage. About it, the infection of CM334 by *N. aberrans* delayed the hypersensitive response to foliar inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *tagetis* [12]. It indicates that *N. aberrans* could induce modifications in some mechanism of resistance in shoot of CM334 chilli pepper plants.

Research on the role of phenylpropanoids active in plant defence against nematode infection is limited compared with studies in the role of this secondary metabolite in fungal infections, although phenolic compound were already cited in previous reports [10, 11]. Both phenolic acids and flavonoids are metabolites synthesized through phenylpropanoid pathway and play important roles in the plant-pathogen interaction [7]. Chlorogenic acid is the only phenolic acid detected in CM334 chilli pepper plants [8]. However, the profiling and characterization of soluble phenolic acids and flavonoids in the genotype CM334 during infection by *N. aberrans* have not been studied. Considering the *in vitro* toxicity to nematodes of different phenolic acids [12], it is possible that CM334 plants contain

other phenolic compounds that play an important role during infection by *N. aberrans*. Determinations of phenolic acids and the lignin content at different time sampling points after nematode inoculation could help to know which phenolic compounds are important for the physical or biochemical mechanisms defence of CM334 chilli pepper plants. In addition, there are not reports about the effect of *N. aberrans* in the flavonoid content during the compatible interaction with CM334 plants. This might help to determine the phenylpropanoid metabolites altered by *N. aberrans* when infection and establishment are successful in plants of the CM334 genotype. Moreover, it will be interesting to evaluate some defence responses in shoot of plants inoculated with *N. aberrans*.

This research proposal will elucidate some changes in the phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* in chilli pepper CM334 which might be associated to the breakdown of resistance to *P. capsici* in CM334 chilli pepper.

2. Materials and methods

2.1 Chili pepper plants

Seeds of resistant chilli genotype (CM334) will be used. The plants will be maintained in growth chambers at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 70 to 80% of relative humidity and with a 14-hour photoperiod at a luminous intensity of 6,768 lux (fluorescent light) and 10 h of dark.

2.2 Analysis of phenylpropanoids

PAL activity will be measured in CM334 plants inoculated with *N. aberrans* alone or in combination with *P. capsici* [4]. Furthermore, the profiling and characterization of soluble phenolic acids and flavonoids in shoot (stem and foliage) of the genotype CM334 during infection by *N. aberrans* will be determined using HPLC-MS [13]. Toxic effects of root flavonoids on second stage juveniles (J_2) of *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne incognita* will be tested *in vitro* [8]. Lignin was assayed by derivatization with thioglycolic acid.

This investigation will be realized following these steps:

- 1) Inoculum preparation and inoculation of CM334 chili pepper plants.
- 2) Experiments of CM334 establishment [14].
- 3) Nematode infection.

- 4) Sampling of plant tissue.
- 5) Protein extraction and PAL activity.
- 6) Quantification of total soluble phenols (TSP).
- 7) Isolation of phenolic acids and flavonoids.
- 8) HPLC–MS analysis.
- 9) Quantification of total lignin.
- 10) Statistical analysis.
- 11) Thesis document and presentation.

3. Acknowledgements

We would like to thank the Structural Research Laboratory (SRL) at the Department of Chemistry of University of Warsaw for using HPLC–MS. SRL has been established with financial support from European Regional Development Found in the Sectorial Operational Programme “Improvement of the competitiveness of Enterprises, years 2004–2005” project no: WPK_1/1.4.3./1/2004/72/72/165/2005/U. The first author thanks Dirección General Académica of Universidad Autónoma Chapingo for the financial support to participate in WiA15.

4. References

[1] Mai W.F., Abawi G.S. 1987. Interaction among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Ann. Rev Phytopathol.* 25: 317-338.

[2] Wallace H.R. 1978. Diagnosis of plant diseases of complex etiology. *Ann Rev Phytopathol.* 16: 379-402.

[3] Zavaleta-Mejía E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Rev Mex Fitopatol.* 20: 118-122.

[4] Hernández-Anguiano A.M., Zavaleta-Mejía E., Carrillo G. 1992. Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1944) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile. *Rev Mex Fitopatol.* 10: 166–174.

[5] Maheshwari T.U., Sharma S.B., Reddy D.D.R., Hawara M.P. 1995. Co-infection of wilt resistant chickpeas by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol.* 27: 649–653.

[6] Manzanilla-López R.H., Costilla M.A., Doucet, M., Franco J., Inserra N.R., Lehman P.S., Del

Prado-Vera I.C., Souza R.M., Evans K. 2002. El género *Nacobbus* Thorne Allen, 1994 (Nematoda: Pratylenchidae): Sistemática, distribución, biología y manejo. *Nematropica.* 32: 149-227.

[7] Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S.S., Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective. *Mol Plant Pathol.* 3: 371–390.

[8] López-Martínez N., Colinas-León MaT., Peña-Valdivia C.B., Salinas-Moreno Y., Fuentes-Montiel P., Biesaga M., Zavaleta-Mejía E. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil.* 338: 399-409.

[9] Walker S.J., Bosland P.W. 1999. Inheritance of phytophthora root rot and foliar blight resistance in pepper. *J Amer Soc Hort Sci.* 124(1): 14–18.

[10] Pegard A., Brizzard A., Fazari O., Soucaze P., Djian-Caporalino C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathol.* 95:158–165.

[11] Wuyts N., Lognay G., Swennen R., De Waele D. 2006. Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant Arabidopsis and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *J Exp. Bot.* 57:2825–2835.

[12] Wuyts N., Swennen R., De Waele D. 2006. Effects of plants phenylpropanoid products and selected terpenoids and alkalids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incógnita*. *Nematol.* 8(1):89–101.

[13] Biesaga M., Pyrzynska K. 2009. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey, *J Chromat. A* 1216: 6620-6626.

[14] Trujillo-Viramontes F., Zavaleta-Mejía E., Rojas-Martínez R.I., Lara J. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annum*). *Nematropica.* 35:37–44.



POSTER SESSION II
Agrifood Biotechnology

Genetic analysis of the *Antirrhinum majus* circadian clock

M.I. Terry⁽¹⁾, J. Weiss ⁽¹⁾, M. Egea-Cortines ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biología Vegetal, Genética Molecular.
Plaza del Hospital s/n, 30202, Cartagena. mitl0@alu.upct.es

Resumen

El reloj circadiano está presente en los reinos bacteria, archaia y eucariota. Se considera un mecanismo adaptativo resultante de la alternancia del día y la noche debido a la rotación terrestre. Se encarga de regular los procesos biológicos de los organismos en relación con las condiciones ambientales. En plantas, según el modelo descrito en la crucifera *Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh, 1842), este reloj consta de una compleja red de genes regulados entre sí y se divide en tres bucles: central, de la mañana y de la tarde. Las principales vías de entrada a este reloj son la luz, la temperatura y los nutrientes. Se conocen diversos mutantes que han permitido el estudio y caracterización de estos genes, así mismo es posible reducir o incrementar la expresión de dichos genes para su investigación. Nuestro objetivo es estudiar este reloj biológico en la especie boca de dragón (*Antirrhinum majus*, L. 1753) en líneas mutantes y transgénicas, así como la influencia de los genes reloj en desarrollo vegetativo, reproductivo y emisión de volátiles.

Palabras clave: Arabidopsis; boca de dragón; genes reloj; ritmo circadiano; RNAi

Abstract

The circadian clock is present in all living kingdoms. It is considered a mechanism of adaptation to the alternance of day and night due to the rotation of the earth, it regulates biological processes of organisms, and coordinates their physiology with the environment. In plants, according to the model described in the crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, 1842), this clock has a complex network of genes regulated and divided into three loops: central, morning and evening. The main entrainment to the clock are light, nutrients and temperature. Various mutants that have allowed the study and characterization of these genes are known, so it is possible to reduce or increase the expression of these genes for investigation. Our goal is to study the biological clock in the specie snapdragon (*Antirrhinum majus*, L. 1753) in mutant and transgenic lines as well as the influence of clock genes in specific biological processes.

Keywords: Arabidopsis; circadian rhythm; clock genes; RNAi; snapdragon

1. Introducción

El reloj circadiano es un mecanismo autorregulado y endógeno presente en los seres vivos, desde bacterias hasta seres humanos, éste interviene en procesos metabólicos, de desarrollo y proporciona una serie de ventajas adaptativas, o dicho de otro modo, permite a un organismo “anticiparse” a los cambios periódicos en el ambiente. Este mecanismo es el resultado de la alternancia del día y la noche como consecuencia de la rotación de la Tierra, “circadiano” hace referencia a aquéllos ciclos que ocurren con una periodicidad aproximada de 24 horas.

Las bases moleculares de este reloj han sido sobre todo estudiadas en un hongo (*Neurospora crassa*) y en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), pero también en plantas, en *Arabidopsis thaliana*, el reloj consiste en una red formada por varios genes

regulados a nivel transcripcional y post-translacional cuyas principales vías de entrada son la temperatura y la luz, mediante fitocromos y criptocromos [1, 2]; según el modelo descrito en *Arabidopsis* distinguimos tres bucles. El bucle central está formado, principalmente por los genes *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* y *TIMING OF CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (TOC1)*, *TOC1* es responsable de reducir la expresión de *CCA1* y *LHY* y éstos a su vez, redundantes y homólogos de los factores de transcripción tipo Myb, se acumulan y se unen al promotor de *TOC1*, reduciendo así su expresión [3, 4], y reprimiendo de este mismo modo a *LUX ARRHYTHMO (LUX)* [5], componente del bucle de la tarde. *CCA1* y *LHY* tienen su pico de expresión durante el día e inducen la expresión de los genes *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7 y 9 (PRR7, PRR9)* que junto a *PRR5* inhiben a *CCA1* y *LHY*; esta unión formada por *CCA1/LHY* y

PPR7/9/5 constituyen el bucle de la mañana [6, 4]. Finalmente, el bucle de la tarde está formado por *EARLY FLOWERING 3* y *4 (ELF3, ELF4)*, en ocasiones llamado complejo de la tarde (EC), y *LUX* que reprimen a *PPR9*, además *LUX* se reprime así mismo. *ZEITLUPE (ZTL)*, una proteína F-Box estabilizada por *GIGANTEA (GI)*, controla la degradación de *TOC1* [7]. En la Figura 1 se resumen estos bucles [4].

Para el estudio de estos genes, se utilizan líneas de plantas mutantes o plantas en las que se ha silenciado o sobreexpresado el gen objeto del estudio. La unión de una construcción que actúa como marcador, por ejemplo luciferasa, al promotor del gen *CAB2*, que codifica la proteína de unión a la clorofila, permite identificar mutantes comparando los picos de expresión con plantas silvestres [8]; por ejemplo, plantas mutantes *lhy-1* muestran una floración independiente del fotoperiodo [9], los dobles mutantes *lhy;cca1* aceleran o retrasan la floración, según el fotoperiodo [10]; *elf3-1* se comporta de manera similar a *lhy-1* en cuanto a tiempo de floración o elongación del hipocótilo se refiere [11], y finalmente, el mutante *toc1-1* puso de manifiesto la importancia de este elemento en la regulación del reloj circadiano en *Arabidopsis* [12].

Por otro lado, es posible silenciar o sobreexpresar un gen. Para silenciar la expresión de un determinado gen, se utiliza ARN de doble cadena e interferencia (RNAi, en inglés), [13, 14], la construcción con este RNAi se introduce en la planta a través un protocolo de infección con *Agrobacterium tumefaciens*; este mecanismo de silenciamiento se basa en que la enzima Dicer detecta y corta este ARN, estos fragmentos son incorporados al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) que se enfrentan al ARN mensajero (RNAm) complementario, éste es cortado y degradado posteriormente. Así entre otros, se ha silenciado *LHY* en *Arabidopsis* mostrando que este gen es indispensable, junto a *CCA1*, para mantener la ritmicidad [15]. La sobreexpresión de un gen se lleva a cabo, entre otros, a través del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV-35S) [16]; se ha descrito que la sobreexpresión de algunos de los genes que forman parte del reloj circadiano, producen alteraciones en el resto de componentes del reloj [17, 18].

Entre otras plantas modelos, cabe mencionar a la boca de dragón (*Antirrhinum majus*) especie perteneciente a la familia de las escrofulariáceas y distribuida por la cuenca mediterránea.

Muchos de sus fenotipos son altamente inestables lo que hace a esta planta especialmente interesante, esta inestabilidad se debe a los transposones, por ejemplo, pueden modificar la coloración de las flores [19]; además, existen al menos, 750 líneas mutantes disponibles [20], tales como *Deficiens*, *Centroradialis*, *Divaricata*, *compacta ähnlich*, *Nitida* o *Grandiflora*, en las que se ha estudiado el desarrollo floral [21, 22, 23, 24, 25]. Además de estos trabajos sobre el desarrollo floral y la asimetría de las flores, también es objeto de estudio en cuanto a emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que tienen entre otras funciones, atraer a polinizadores, actuar como repelentes de herbívoros [26] e incluso pueden resultar tóxicos para otras especies de plantas [27]. La emisión de estos compuestos está regulada y varía a lo largo del día, en el caso de la boca de dragón, estos volátiles se liberan sobre todo durante el día y atraen a polinizadores, como abejas [28], en cambio, para otras especies como la petunia (*Petunia spp.*) este máximo en la emisión se produce durante la noche y es polinizada por polillas [28, 29].

2. Objetivos

En el presente trabajo, se estudiará el reloj circadiano en la especie *Antirrhinum majus*, para ello disponemos de varias líneas mutantes (Figura 2), una de éstas es especialmente interesante ya que presenta un fenotipo y otras características, como la floración, claramente distintos comparado con líneas silvestres, como los descritos en otros mutantes (por ejemplo, *Arabidopsis lhy;cca1*) y tenemos como objetivo identificar el gen o los genes responsables; así mismo, también contamos con líneas en las que se han silenciado elementos de este reloj biológico. Otro trabajo a realizar, además de cuantificar las diferencias de expresión de los genes reloj en plantas mutantes, transgénicas y silvestres, es estudiar la emisión de volátiles y su variación en distintas condiciones de luz y temperatura en las líneas mencionadas con anterioridad.

3. Referencias bibliográficas

[1] Somers, D., Devlin, P., Kay, S. 1998. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*. 282(5393): 1488-1490.

- [2] Hotta, C., Gardner, M., Hubbard, K. et al. 2007. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant Cell Environ.* 30(3): 333-349.
- [3] Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y. et al. 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required for maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell.* 2: 629-641.
- [4] Calixto, C., Waugh, R., Brown, J. 2015. Evolutionary relationships among barley and *Arabidopsis* core circadian clock and clock-associated genes. *J Mol Evol.* 80: 108-119.
- [5] Hazen, S., Schultz, T., Pruneda-Paz, J. et al. 2005. LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *P Natl Acad Sci USA.* 102(29):10387-10392.
- [6] Nakamichi, N., Kita, M., Iso, T. et al. 2005. The *Arabidopsis* pseudo-response regulators, PRR5 y PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant Cell Physiol.* 46(4): 609-619.
- [7] Kim, W., Fujiwara, S., Suh, S. et al. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature.* 449(7160): 356-360.
- [8] Millar, A., Carre, I., Strayer, C. et al. 1995. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science.* 267(5201): 1161-1163.
- [9] Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A. et al. 1998. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell.* 93: 1219-1229.
- [10] Miyata, K., Calviño, M., Oda, A. et al. 2011. Suppression of late-flowering and semi-dwarf phenotypes in the *Arabidopsis* clock mutant *lhy-12;cca1-101* by *phyB* under continuous light. *Plant Signal Behav.* 6(8): 1-10.
- [11] Song, H. 2012. Interaction between the late elongated hypocotyl (LHY) and early flowering (ELF3) genes in *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Genom.* 34(3): 329-337.
- [12] Somers, D., Webb, A., Pearson, M. et al. 1998. The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 125(3): 485-494.
- [13] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811.
- [14] Wesley, S., Heliwell, C., Smith, N. et al. 2001. Construct design for efficient and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27(6): 581-590.
- [15] Alabadí, D., Yanovsky, M., Más, P. et al. 2002. Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 12(2): 757-761.
- [16] Holtorf, S., Apel, K., Bohlmann, H. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 29(4): 637-646.
- [17] Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M. et al. 2002. The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: II. Characterization with CCA1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.* 43(1): 118-122.
- [18] Serikawa, M., Miwa, K., Kondo, T. et al. 2008. Functional conservation of clock-related genes in flowering plants: Overexpression and RNA interference analyses of the circadian rhythm in the monocotyledon *Lemna gibba*. *Plant Physiol.* 146(4): 1952-1963.
- [19] Luo, D., Coen, E., Doyle, S. et al. 1991. Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1: 59-69.
- [20] Whibley, A., Baxter, C. 2004. *Antirrhinum*. *Curr Biol.* 14(7): 260-261.
- [21] Sommer, H., Beltrán, J., Huisjer, P. et al. 1990. DEFICIENS, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9(3): 605-613.
- [22] Zachgo, S., Silva, E., Motte, P. et al. 1995. Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic DEFICIENS gene in vivo and in vitro by using a temperature-sensitive mutant. *Development.* 121: 2861-2875.
- [23] Cremer, F., Lönning, W., Saedler, H. et al. 2001. The delayed terminal flower phenotype is caused by a conditional mutation in the CENTRORADIALIS gene of snapdragon. *Plant Physiol.* 126: 1131-1141.
- [24] Galego, L., Almeida, J. 2002. Role of DIVARICATA in the control of dorsoventral asymmetry in *Antirrhinum* flowers. *Gene Dev.* 16(7): 880-891.
- [25] Delgado-Benarroch, L., Weiss, J., Egea-Cortines, M. 2009. The mutants *compacta ähnlich*, *Nitida* and *Grandiflora* define developmental compartments and a compensation mechanism in floral development

in *Antirrhinum majus*. J Plant Res. 122(5): 559-569.

[26] Paré, P., Tumlinson, J. 1999. Uptake on planta-insect interactions volatiles as a defense against insect herbivores. Plant Physiol. 121: 325-331.

[27] Horiuchi, J., Badri, D., Kimball, B. et al. 2007. The floral methyl benzoate, from snapdragon (*Antirrhinum majus*) triggers phytotoxic effects in *Arabidopsis thaliana*. Planta. 226(1): 1-10.

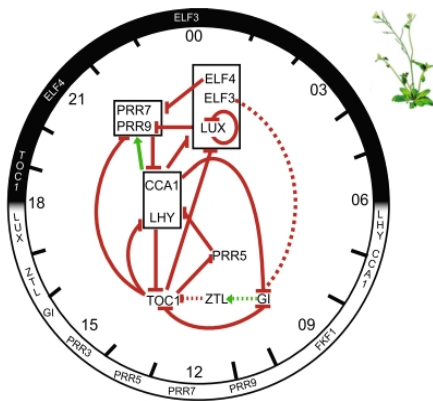
[28] Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C. et al. 2001. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. Plant Cell. 13(10): 2333-2347.

[29] Dudareva, N., Murfitt, L., Mann, C. et al. 2000. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. Plant Cell. 12(6): 949-961.

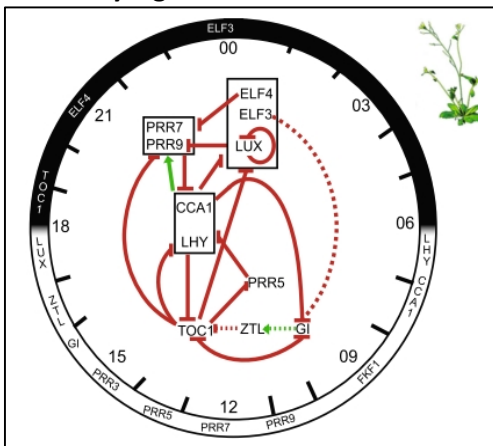
Figura 1. Bucles del reloj de *Arabidopsis*. La línea sólida indica bucles de retroalimentación transcripcional, la línea discontinua indica regulación post- translacional. El color verde indica activación, el color rojo, represión. [4]



Figura 2. Flores de *Antithirrinum majus*. A: flor típica. B: mutante compacta. C: mutante deficientes.



Tablas y Figuras





POSTER SESSION III
Vegetal Production
Technology and
Engineering

Impact of production system on development of insecticide resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)

J. Abellán^(1,2), V. Quinto⁽¹⁾, C. Grávalos⁽¹⁾, E. Fernández⁽¹⁾, P. Bielza⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena. España.

⁽²⁾jaimeabellan@hotmail.com

Resumen

El trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), se ha convertido en uno de los insectos más difíciles de controlar en la agricultura intensiva del sureste de España. Sin embargo, los problemas de resistencia son ligeramente diferentes en dos áreas colindantes, Murcia y Almería, con distinto sistema de producción, (En Murcia, con un gran abanico de cultivos (protegidos y al aire libre), la eficacia del control químico se mantiene frecuentemente a lo largo del ciclo de cultivo, donde siguen estrategias de gestión de la resistencia a los insecticidas (IRM). Sin embargo, en Almería, con un sistema de producción basado en el cultivo de plantas en invernaderos, los problemas de resistencia son mucho más severos). Se recolectaron 36 poblaciones de campo del trips de plantas de pimiento en dos fechas diferentes en Murcia y Almería en 2005 y 2006. Las poblaciones de trips recolectadas se expusieron a una concentración de diagnóstico de spinosad, metiocarb, acrinatrín y formetanato. Los resultados permitieron identificar mayores niveles de resistencia en Almería en comparación con Murcia a lo largo del ciclo de cultivo. Se discute el impacto de los sistemas de producción y de las prácticas agrícolas de cada área en el desarrollo y estabilidad de la resistencia a insecticidas.

Palabras clave: trips, resistencia a insecticidas, estructura productiva

Abstract

The western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), has become one of the most difficult insects to control in the intensive agriculture of southeastern Spain. However, resistance problems are quite different in two neighboring areas, Murcia and Almeria, with distinct production systems (In Murcia, with a wide range of crops (protected and outdoor crops), efficacy of chemical control is frequently maintained along the growing season where insecticide resistance management (IRM) strategies are followed. However, in Almeria, with a production system based on vegetables in greenhouses, resistance problems are much more severe.) Thirty-six field populations of western flower thrips from sweet pepper crops were collected in two different dates in Murcia and Almeria in 2005 and 2006. Western flower thrips populations collected were exposed to a diagnostic concentration of spinosad, methiocarb, acrinathrin, and formetanate. The impact of production systems and agricultural practices of each area on the development and stability of insecticide resistance is discussed.

Keywords: Thrips, insecticide resistance, cropping-structure

1. Introducción

El trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), es un insecto polífago que constituye una de las mayores plagas de hortalizas, frutas y cultivos ornamentales en el mundo. Los trips dañan los cultivos a través de su alimentación directa y transmitiendo virus a las plantas del género tospovirus. En los pasados 10 años *F. occidentalis* se ha convertido en uno de los insectos más difíciles de controlar de la agricultura intensiva del sureste de España, en las provincias de Murcia y Almería, principalmente

debido al desarrollo de resistencia a toda clase de insecticidas usados extensivamente contra ella [1-3].

Sin embargo, los problemas de resistencia son ligeramente diferentes en estas dos áreas, con distintos sistemas de producción. En Murcia, con un gran abanico de cultivos (protegidos y al aire libre), la eficacia del control químico se mantiene frecuentemente a lo largo del ciclo de cultivo, donde siguen estrategias de gestión de la resistencia a los insecticidas (IRM). Sin embargo, en Almería, con un sistema de producción basado en el cultivo de plantas en invernaderos, los

problemas de resistencia son mucho más severos. Las infecciones de trips son difíciles de controlar con los insecticidas registrados, independientemente de la estrategia IRM utilizada y a pesar de un gran número de tratamientos específicos.

En Murcia, las poblaciones de trips empiezan a aparecer en abril, mientras que en Almería, es el fin del ciclo de cultivo. Sin embargo, para septiembre, cuando comienza el ciclo de cultivo en Almería, es el fin en Murcia. Al recolectar al principio del ciclo del cultivo, se evita la influencia de la estrategia de tratamientos a insecticidas en cada agricultor, y permiten la estimación de los niveles de resistencia al comienzo del control de trips.

El objetivo de este trabajo fue el de comparar los niveles de tolerancia de las poblaciones de trips recogidas en Murcia y Almería para estudiar la variación temporal y geográfica de la susceptibilidad de los trips al spinosad, acrinatrín, formetanato y metiocarb, así como, monitorizar la evolución de la resistencia en los últimos años.

2. Materiales y Métodos

2.1 Insectos

Se recogieron 36 poblaciones de campo del trips occidental de las flores, de cultivos de pimiento dulce en Murcia y Almería en 2005 y 2006. Todos los invernaderos estaban bajo control químico. Las muestras recogidas eran de 50-200 trips adultos, en dos fechas diferentes, abril y septiembre. Las muestras recogidas al final del ciclo de cultivo permiten estimar la evolución de la resistencia.

Se usó un método de cría estandarizado para mantener las poblaciones de trips en el laboratorio [4].

2.2 Bioensayos

Se utilizó el spinosad técnico (90,4 %; Dow AgroScience, Indianapolis, IN), acrinatrín técnico (95 %, Cheminova A/S, Lemvig, Dinamarca), formetanato técnico (92 %; Bayer CropScience, Monheim, Alemania) y metiocarb (97 %; Bayer CropScience, Monheim, Alemania), usando bioensayos tópicos. Se prepararon diluciones de los insecticidas en acetona, excepto para el formetanato, que se diluyó en metanol. Se ensayó una concentración de diagnóstico más un control (sin insecticida), para cada población en tres repeticiones de 30 adultos de trips por dosis. Sólo se usaron trips hembras. Se realizaron aplicaciones usando una pipeta Pasteur, permitiendo empapar cada insecto completamente con una gota. Pasados 5

segundos los trips tratados se colocaron sobre otro filtro de papel, aspirados con la ayuda de un aspirador entomológico y depositados en viales de plástico (una repetición de 30 adultos por vial) con hojas de pimiento dulce para su alimentación. Los viales se mantuvieron en posición vertical a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad) horas. La mortalidad se evaluó después de 24 horas; los individuos que no se movían se contaron como muertos.

Basándose en los datos de la toxicidad de poblaciones de campo en estudios previos [2,3], se escogió una concentración diagnóstico para cada insecticida que causara el 80 % de mortalidad. Las concentraciones diagnóstico fueron de 800 ppm para el acrinatrín, 8000 ppm para el formetanato, 2000 ppm para el metiocarb y 120 ppm para el spinosad.

2.3 Análisis de datos

La correlación entra la toxicidad al spinosad, acrinatrín, formetanato y metiocarb se determinó calculando coeficientes de correlación para evitar la influencia del origen geográfico, los datos se analizaron separadamente para Almería (19 poblaciones) y Murcia (17 poblaciones).

3. Resultados y Discusión

Los datos de mortalidad para las poblaciones de trips recogidas en Murcia y Almería en 2005 y 2006 y expuestas a spinosad, metiocarb, acrinatrín y formetanato se presentan en las figuras 1-4. Las concentraciones de diagnóstico permitieron la identificación de mayores niveles de resistencia en Almería comparadas con Murcia a lo largo del ciclo de cultivo.

La mortalidad a la concentración de diagnóstico para el spinosad, igual a la dosis máxima de campo (120 ppm), varió del 34-81 % en las poblaciones de trips de Almería y del 73-100 % en las poblaciones de trips de Murcia (Fig. 1). Había grandes diferencias en las susceptibilidades al acrinatrín y formetanato entre las poblaciones obtenidas de Almería y Murcia (Fig. 2 y 3). Las mortalidades a la concentración de diagnóstico del acrinatrín (800 ppm) y del formetanato (8000 ppm) fueron del 17-31 % en Almería y del 77-100 % en Murcia (Fig. 2) y del 14-41 % en Almería y del 48-99 % en Murcia (Fig. 3), respectivamente, lo que indica variaciones geográficas grandes. La toxicidad del metiocarb fue mayor para las poblaciones de trips en ambas áreas (Fig. 4). Sin embargo, la mortalidad a la concentración de diagnóstico del metiocarb (2000 ppm) varió del 56-90 % en Almería y del 94-100 % en Murcia.

En Almería, las toxicidades del acrinatrín y el formetanato, ($r = 0,85$), del acrinatrín y el metiocarb ($r = 0,74$), y del formetanato y el metiocarb ($r = 0,73$), mostraron una fuerte correlación ($P < 0,01$). En contraste, las toxicidades del acrinatrín, formetanato y metiocarb no se correlacionaron con la del spinosad ($r = -0,30, -0,34$ y $-0,03$, respectivamente; $P > 0,05$). En Murcia, solo las toxicidades de acrinatrín y formetanato mostraron una correlación positiva relevante ($r = 0,63, P < 0,01$). La toxicidad del metiocarb no mostró correlación con las del acrinatrín y el formetanato ($r = 0,28$ y $0,38$, respectivamente, $P > 0,05$). Al igual que en Almería, en Murcia la correlación de la toxicidad del spinosad con las del acrinatrín, el formetanato y el metiocarb no fueron relevantes ($r = -0,06, -0,05$ y $0,40$, respectivamente; $P > 0,05$).

En el presente estudio, la mortalidad del spinosad ha sido mayor del 50 % en todas las poblaciones recogidas al principio del ciclo del cultivo (septiembre) en Almería, lo que sugiere una recuperación de la susceptibilidad al spinosad en las poblaciones de trips durante los últimos años. La naturaleza recesiva de la resistencia al spinosad [5] y el uso limitado del spinosad a un máximo de tres aplicaciones por cultivo, junto con la estrategia IRM y las medidas adicionales tomadas en el área de Almería (por ejemplo, la no aplicación de spinosad en algunos invernaderos), han permitido una reducción de la resistencia al spinosad en este área problemática.

Al final del ciclo de cultivo del pimiento (abril) en Almería que es el cultivo más tratado para el control del trips, la susceptibilidad al spinosad decreció (Fig. 1). Así, la estrategia IRM por sí sola, es probable que no sea suficiente para mantener la susceptibilidad al spinosad, como sugieren los fallos en el control de campo de los que se tiene constancia por los agricultores al final del ciclo de cultivo.

En contraste, la resistencia al acrinatrín y formetanato es muy alta en todas las poblaciones de Almería, independientemente de la fecha de recogida (Fig. 2 y 3).

El mecanismo involucrado en la resistencia al acrinatrín y formetanato es metabólico, mediado por las P450 monooxigenasas [6], mientras que el mecanismo de resistencia al spinosad se debe a la insensibilización del punto de acción [3,5]. A pesar de la resistencia al spinosad que es la única seleccionada en los tratamientos, la resistencia metabólica al acrinatrín y al formetanato puede

ser seleccionada para un gran abanico de productos, incluso para aplicaciones inofensivas. Por tanto, la presión de selección para este mecanismo de resistencia es muy alta en área de gran uso de insecticidas como Almería. Además, la resistencia al acrinatrín es dominante a la dosis de campo recomendada, (Dominancia efectiva) [7], lo que favorece la resistencia porque los heterocigotos son más difíciles de matar en condiciones de campo.

La mortalidad a la concentración diagnóstico del metiocarb (2000 ppm, dosis de campo recomendada) fue superior que la del acrinatrín y formetanato tanto en Almería como en Murcia (Fig. 4). Por lo que, la elevada mortalidad a la concentración diagnóstico probablemente refleje una gran efectividad en el campo. Estos resultados están en concordancia con estudios previos [2] que mostraban que el metiocarb era más efectivo en dosis de campo que el acrinatrín y formetanato.

El análisis mostró una fuerte correlación entre la toxicidad del acrinatrín, el formetanato y el metiocarb, pero no con la toxicidad del spinosad, en las poblaciones de trips de Almería. Estos resultados van en concordancia con los de estudios previos [1,3,6], que mostraban una resistencia cruzada entre el acrinatrín, el formetanato y el metiocarb, con un mecanismo de resistencia metabólica común y una carencia de resistencia cruzada con spinosad con alteración del punto de acción.

En Murcia, solo las toxicidades del acrinatrín y el formetanato mostraron una correlación positiva relevante. La falta de una correlación significativa de la toxicidad del metiocarb con las del acrinatrín y el formetanato son explicadas a través de que las mortalidades del metiocarb a la concentración diagnóstico son muy altas en Murcia (94-100 %)(Fig. 4).

4. Conclusiones

Existen grandes diferencias en la susceptibilidad a los insecticidas analizados entre las poblaciones recogidas de Almería y Murcia. Los problemas de resistencia parecen más serios en Almería, reflejando las distintas prácticas agrícolas de esta área: gran frecuencia de aplicaciones de insecticidas; presencia constante de huésped; carencia de refugios para poblaciones susceptibles y, en definitiva, un sistema de producción que permite una gran presión de selección.

5. Referencias bibliográficas

[1] Espinosa, P. J., P. Bielza, J. Contreras, and A. Lacasa. 2002a. Field and laboratory selection of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) for resistance to insecticides. *Pest Manag. Sci.* 58: 920-927.

[2] Espinosa, P. J., P. Bielza, J. Contreras, and A. Lacasa. 2002b. Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (south-east Spain). *Pest Manag. Sci.* 58: 967-971.

[3] Bielza, P., V. Quinto, J. Contreras, M. Torné, A. Martín, and P. J. Espinosa. 2007a. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of southeastern Spain. *Pest Manag. Sci.* 63:682-687.

[4] Espinosa, P. J., J. F. Fuentes, J. Contreras, P. Bielza, and A. Lacasa. 2002c. Método de cría en masa de *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 28: 385-390.

[5] Bielza, P., V. Quinto, E. Fernández, C. Grávalos, and J. Contreras. 2007b. Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 100: 916-920.

[6] Espinosa, P. J., J. Contreras, V. Quinto, C. Grávalos, E. Fernández, and P. Bielza. 2005. Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Manag. Sci.* 61: 1009-1015.

[7] Bielza, P., V. Quinto, E. Fernández, C. Grávalos, J. Abellán, and D. Cifuentes. 2008b. Inheritance of resistance to acrinathrin in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Pest Manag. Sci.* 64: 584-588.

Tablas y Figuras

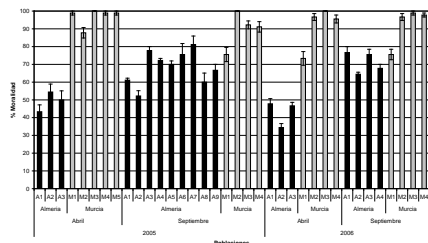


Figura 1. Mortalidad (Media + Error estándar) para las poblaciones de *F.occidentalis* recogidas en Almería y Murcia en 2005 y 2006, expuestas a una concentración de diagnóstico de spinosad (120 ppm).

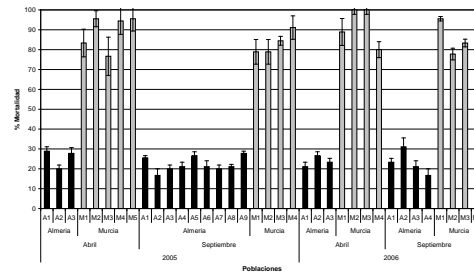


Figura 2. Mortalidad (Media + Error estándar) para las poblaciones de *F.occidentalis* recogidas en Almería y Murcia en 2005 y 2006, expuestas a una concentración de diagnóstico de acrinatrín (800 ppm).

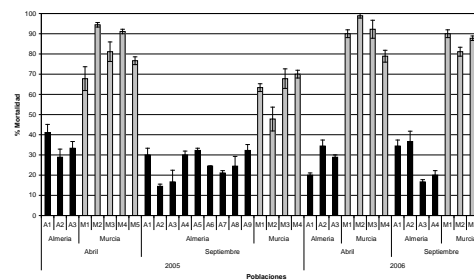


Figura 3. Mortalidad (Media + Error estándar) para las poblaciones de *F.occidentalis* recogidas en Almería y Murcia en 2005 y 2006, expuestas a una concentración de diagnóstico de formetanato (8000 ppm).

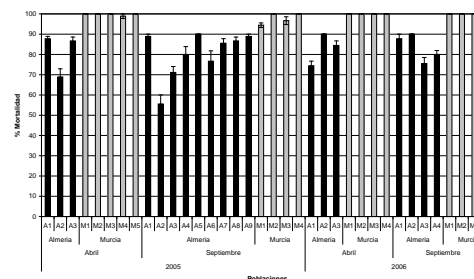


Figura 4. Mortalidad (Media + Error estándar) para las poblaciones de *F.occidentalis* recogidas en Almería y Murcia en 2005 y 2006, expuestas a una concentración de diagnóstico de metiocarb (2000 ppm).

New strategies for controlling the development of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.), based on the induction of its natural defenses

M.A. Parra, J.A. Martínez

Departamento de Producción Vegetal, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España. E-mail: ma.parra@upct.es

Resumen

Se pretende abordar el desarrollo de una estrategia de control integrado de enfermedades poscosecha (IDM – “Integrated Disease Management”) de limón, uno de los principales frutos producidos en la Región de Murcia, basada en la utilización de procedimientos aplicados de inducción a las defensas naturales de los frutos aplicados antes y después de la recolección con el fin de aumentar sus resistencia a las enfermedades poscosecha y prolongar la calidad durante el almacenamiento. Esta estrategia se basa en la optimización de una combinación de tratamientos y procedimientos aplicados de tal manera que la acción conjunta de todos ellos se convierta en una especie de protocolo o acción integrada y segura de apuesta por la calidad en detrimento de la aparición de podredumbres.

Palabras clave: Fisiopatías; podredumbres; patógenos poscosecha; fitoanticipinas; fitoalexinas.

Abstract

The study of a new strategy for integrating control postharvest diseases (IDM - "Integrated Disease Management") of lemon, one of the main fruits produced in the region of Murcia, based on the management of both pre and postharvest systems and procedures in order to induce the natural defenses of harvested fruits, is developed. The overall aim is based on an increase of the fruit resistance against postharvest diseases and maintains its quality during storage. This strategy would consist of a combination of some treatments and procedures in order to create an integrated system by combining all of them under an adequate strategy based on improving the quality and extending the shelf-life at the expense of fruit decay.

Keywords: Physiological disorders; decay; postharvest pathogens; phytoanticipins; phytoalexins.

1. Introducción

Murcia es una región eminentemente agrícola donde la producción y superficie destinada a los productos hortofrutícolas es muy elevada y constituye una de sus principales fuentes de riqueza, siendo el pilar básico del crecimiento de su economía. La producción regional hortofrutícola se acerca a los 3 millones de toneladas, destacando, por grupos, las hortalizas con 1.504.000 tm, los cítricos con 631.500 tm y los frutales (incluyendo la uva de mesa) con 502.150 tm [1]. Estos datos denotan el elevado número de empresas y cooperativas agrícolas afincadas en la Región de Murcia que deben mover cada año este elevadísimo volumen de productos frescos (frutas, hortalizas y ornamentales) cuyo destino es básicamente el mercado exterior. Se estima que el 12% de la población regional trabaja en este sector y su aportación al PIB regional es de un 4,9%. La facturación global de estos productos frescos se sitúa, según campañas, en torno a los 2.600 millones de euros anuales [1].

Dado que el destino de los productos hortofrutícolas frescos producidos en la Región es fundamentalmente el mercado exterior, estos productos son sometidos necesariamente a los procesos de transporte y almacenamiento hasta que llegan a manos del consumidor. Los productos hortofrutícolas frescos están vivos, es decir, respiran y presentan un metabolismo particular porque ya no están sujetos al aporte de nutrientes y energía de la planta de donde proceden. En este proceso, los vegetales van disminuyendo gradualmente sus defensas físicas y químicas contra el ataque de patógenos poscosecha y van perdiendo calidad general, textura e hidratación [2, 3].

La aparición de podredumbres es la principal causa de pérdidas económicas de los productos frescos almacenados, incluso bajo buenas prácticas de almacenamiento. Esto es debido, como a la pérdida gradual de las defensas, al uso restringido de productos sintéticos efectivos por las nuevas normativas destinadas a eliminar o reducir el uso de los fungicidas de síntesis

(normativas EU No 540/2011 de 25 de mayo de 2011 y Reglamento (CE) Nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009) y a la aparición de resistencias a estos fungicidas por el uso continuado de determinados principios activos [4]. Las pérdidas que ocurren en cítricos durante su almacenamiento y transporte oscilan comúnmente entre el 3 y el 6%. Otro dato adicional corresponde a la fruta de pepita que, durante un período habitual de almacenamiento refrigerado, se alcanza con facilidad el valor de pérdidas comprendido entre el 2 y 3% debidas exclusivamente a podredumbres [5-7]. En la actualidad, las pérdidas económicas se cifran entre el 4 y 8% en aquellos países donde se utiliza comúnmente la refrigeración como principal método de conservación e incluso hasta el 50% cuando existen restricciones al uso de la refrigeración [8].

Bajo todo este panorama descrito en las líneas anteriores, se deduce que es difícil encontrar una solución plenamente eficaz en el control de las podredumbres de los frutos actuando únicamente en un determinado punto de la producción. Por ello, para optimizar una estrategia conjunta se deben considerar los siguientes puntos:

- 1.- Cuidados durante el cultivo con el fin de conseguir un producto de calidad.
- 2.- Cosecha cuidadosa, evitando los daños mecánicos.
- 3.- Almacenamiento adecuado.

Adicionalmente, es recomendable la utilización de fitosanitarios o plaguicidas admitidos en los frutos cítricos pero, ante la sucesiva eliminación de materias activas por la aplicación de normativas, es necesario experimentar con métodos físicos y/o químicos de baja o nula toxicidad para la reducción o eliminación de los fitosanitarios sintéticos. En este punto, ya hay estudios acerca del efecto de la aplicación de varias estrategias alternativas o complementarias al uso de plaguicidas. Éstas se resumen en las siguientes [9-14]:

- 1.- Sustancias naturales con actividad antimicrobiana.
- 2.- Tratamientos físicos para reducir las podredumbres.
- 3.- Uso de microorganismos antagonistas a los patógenos.

4.- Potenciación de la respuesta defensiva de la planta u órgano cosechado ante patógenos mediante el uso de elicitores.

La investigación actual sobre el tema está poniendo de manifiesto que pueden desarrollarse estrategias alternativas al uso de plaguicidas que se basen fundamentalmente en la aplicación de sustancias de nula o muy baja toxicidad, tratamientos físicos de defensa o la aplicación de microorganismos inocuos o antagonistas que presenten toxicidad únicamente contra los microorganismos patógenos [15].

Tanto las plantas intactas como sus órganos cosechados tienen mecanismos de defensa contra los patógenos. Una buena parte de estos mecanismos son compuestos defensivos propios de las plantas, denominados defensas preformadas, mientras que otros son inducidos a su síntesis en una respuesta defensiva, aun estando presentes ya en la planta (fitoanticipinas). Otro tipo de sustancias defensivas no se encuentran en la planta sana, pero se inducen cuando se infectan con un patógeno reconocido (fitoalexinas), entre otros mecanismos [2, 3, 16].

Los objetivos del trabajo se remarcaban a continuación:

- 1.- Realizar una revisión y aplicación exhaustiva de los sistemas modernos de control de este tipo de podredumbres que, de acuerdo con la bibliografía, eliminen o reduzcan el uso de los habituales fungicidas de síntesis y aplicar experimentalmente métodos de potenciación de las defensas naturales, como medida alternativa al uso de los fungicidas para el control de estas podredumbres. Los métodos y procedimientos seleccionados se especifican en las siguientes secciones.
- 2.- Estudio y aplicación de inductores y procedimientos de inducción de defensas en frutos de limón.
- 3.- Estudio de los mecanismos de mantenimiento de los compuestos de defensa inducidos y no inducidos durante la comercialización de los mismos.

El objetivo final, fruto de la integración de los objetivos, va encaminado a desarrollar una estrategia de control integrado de enfermedades poscosecha (IDM – “Integrated Disease Management”) de frutos de limón.

2. Materiales y Métodos

Para el aislamiento de los patógenos *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, se tomará material sano de varias localizaciones y se someterá a condiciones controladas para obtener las podredumbres (Fig. 1). Se purificarán los aislados obtenidos y se identificarán a nivel de especie por la aplicación de la PCR y posterior secuenciación. Se estudiarán los caracteres fenotípicos de los aislados. El plan de actuación en la inducción a la síntesis de compuestos naturales de defensa se realizará, según el mecanismo de acción perseguido, durante el período de crecimiento de los frutos, una vez cosechados y durante su almacenamiento. Los tratamientos en campo se realizarán por pulverización a frutos debidamente marcados.

Se medirá el estado de madurez de los frutos cosechados por medio del índice de madurez que relaciona el contenido en sólidos solubles (°Brix) y la acidez por valoración con NaOH. Adicionalmente se medirá el color por medio de un colorímetro triestímulo Minolta representado por los valores L*, a*, b*, C* y h°. A partir de estos valores, se calculará el índice de color (IC), que mide la madurez de los frutos de limón de acuerdo con el color del flavedo y se expresa como $IC = 1.000 \times (a/(L \times b))$. Estos valores permitirán correlacionar la madurez de los frutos con eficacia del sistema de inducción.

Las variables resultado que medirán la bondad de los tratamientos reductores de las podredumbres serán la incidencia, medida como el porcentaje total de frutos afectados de podredumbre y el porcentaje por grado de desarrollo. Para este caso se diferenciará entre frutos blandos sin micelio, con micelio blanco y con micelio esporulado (se distingue por el color de la masa de conidios, Fig. 2). Para medir la severidad de las podredumbres se calculará el Índice de Desarrollo de la Podredumbre (IDP), propuesto por Martínez y González, [4] y que se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$IDP = [(P_1 \times 0) + (P_2 \times 1) + (P_3 \times 2) + (P_4 \times 3)] / TF$$

donde: P₁ es el número de frutos sin podredumbre; P₂ es número de frutos podridos sin micelio; P₃ es el número de frutos con micelio blanco y P₄ corresponde al número de frutos podridos con micelio coloreado. TF es el total de frutos. Este índice varía entre los valores de 0 y 3, siendo 0 (no hay podredumbre) y 3 (todos los frutos están afectados y con micelio esporulado). La inducción de defensas se valorará de acuerdo con la metodología descrita en Lu *et al.* [17].

3. Resultados y Discusión

Se espera tener resultados en varias vertientes que consideramos básicas para ser estudiadas con el objetivo final de obtener un IDM eficaz y ahondar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la resistencia:

- 1.- Mecanismos de potenciación de las defensas naturales de los frutos de limón.
- 2.- Caracterización de la microbiota natural de los limones de la Región que presenten actividad antagónica contra los patógenos poscosecha de los frutos de limón y mecanismo de acción (especialmente aquellos microorganismos capaces de aumentar las defensas).
- 3.- Identificar las principales acciones capaces de potenciar significativamente las defensas con el fin de establecer un plan IDM lo más simple y práctico posible.

4. Conclusiones

El desarrollo de esta Tesis Doctoral permitirá poner de manifiesto los mecanismos de síntesis de compuestos naturales de defensa de los cítricos y su efecto sobre la reducción de las podredumbres. Pretende sentar las bases del conocimiento de las podredumbres más habituales en uno de los productos hortofrutícolas frescos más producidos en la Región de Murcia y establecerá un sistema de control integrado de enfermedades poscosecha IDM.

5. Agradecimientos

A la empresa S.A.T. Nº 9821 Grupo CFM, Murcia, por la financiación y colaboración en este estudio. La autora M.A. Parra agradece a la UPCT la adjudicación de una Beca de Iniciación a la Actividad Investigadora (año 2015).

6. Referencias bibliográficas

- [1] INFO. 2013. Los productos hortofrutícolas en la Región de Murcia. Ed: Instituto de Fomento de la Región de Murcia. Murcia, España. Pág. 11.
- [2] Barkai-Golan R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. Ed: Elsevier. Amsterdam, Holanda, Pág. 418.

[3] Narayanasamy P. 2006. Postharvest Pathogens and Disease Management. Ed: Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Pág. 578.

[4] Martínez J.A., González R. 2012. Control de las podredumbres verde y azul de los cítricos con extractos de aceites esenciales de clavo y canela. Levante Agrícola 441: 202-209.

[5] Palazón I.J. 1973. Las podredumbres en frutos conservados por frío. ITEA 13: 3-20.

[6] Tuset J.J. 1987, Podredumbres de los Frutos Cítricos. Ed: Conselleria D'Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana. Valencia, España. Pág. 206.

[7] FAO. 1993. Prevención de Pérdidas de Alimentos Poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos: manual de capacitación. Ed: FAO. Roma, Italia. Pág. 124.

[8] Mari M., Neri F., Bertolini P. 2010. New approaches for postharvest disease control in Europe. En: Post-harvest Pathology. Ed: Springer. Dordrecht, Holanda. Pág.: 119-135.

[9] Hernández-Lauzardo A.N., Bautista-Baños S., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-Rodríguez, A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. Revista Mexicana de Fitopatología 25(1): 66-74.

[10] Martínez J.A. 2007. Nuevas estrategias de control de las podredumbres ocasionadas por, *Penicillium* sp. en los frutos cítricos: aceites esenciales. Levante Agrícola 388: 393-402.

[11] Palou L., Smilanick J.L., Droby S. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. Stewart Postharvest Review 4(2). doi: 10.2212/spr.2008.2.2.

[12] Tamm L., Thürig B., Fliessbach A., Goltlieb A.E., Karavani S., Cohen Y. 2011. Elicitors and soil management to induce resistance against fungal plant diseases. NJAS-Wagen. J. Life Sc. 58: 131-137.

[13] Martínez J.A. 2012. Natural fungicides obtained from plants. En: Fungicides for Plant and Animal Diseases. Ed: InTech. Rijeka, Croacia. Pág. 298.

[14] Moscoso-Ramírez P.A., Palou L. 2013. Evaluation of postharvest treatments with chemical resistance inducers to control green and blue molds on orange fruit. Postharvest Biol. Technol. 85: 132-135.

[15] Terry L.A., Joyce D.C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. Postharvest Biol. Technol. 32: 1-13.

[16] Adikaram N., Karumanayake C., Abayasekara C. 2010. The role of pre-formed antifungal substances in the resistance of fruits to postharvest pathogens. En: Post-harvest Pathology. Ed: Springer. Dordrecht, Holanda. Pág.: 1-11.

[17] Lu L., Lu H., Wu C., Fang W., Yu C., Ye C., Shi Y., Yu T., Zheng X. 2013. *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. Postharvest Biol. Technol. 85: 196-202.

Tablas y Figuras

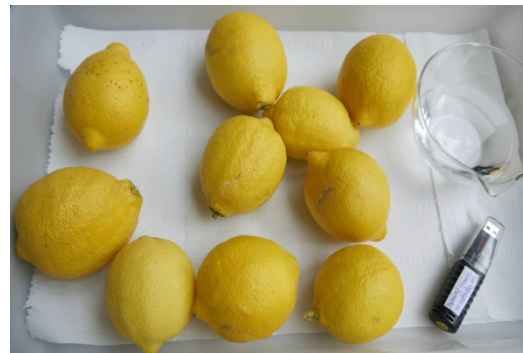


Figura 1. Desarrollo de podredumbre natural en frutos almacenados en cámara húmeda a temperatura ambiente



Figura 2. Limón afectado de *Penicillium digitatum* (masa esporógena verde) y *P. italicum* (masa esporógena azul)

Protocols for feasibility study of using saline reclaimed water combined with deficit irrigation strategies in citrus

C. Romero-Trigueros, P.A. Nortes, E. Nicolás

⁽¹⁾ Departamento de Riego. Centro de Edafología y Biología Aplicada al Segura (CEBAS-CSIC). Campus Universitario de Espinardo, 30100. Espinardo, Murcia (España). cromero@cebas.csic.es

Resumen

Se presenta un protocolo experimental diseñado para evaluar la respuesta agronómica y fisiológica de los cítricos al riego deficitario controlado (RDC) con aguas regeneradas (AR). Para ello se van a evaluar sus efectos sobre la planta (fisiología, producción, calidad y seguridad de la cosecha) y el medio ambiente (acumulación de sales y disponibilidad de nutrientes), además de analizar, desde un punto de vista integral, su sostenibilidad a medio-largo plazo. Los ensayos se están realizando en una finca comercial de cítricos, ubicada al noreste de la Región de Murcia. La parcela experimental de 1 ha está cultivada con árboles de pomelo 'Star Ruby' (*Citrus paradisi* Macf) de 10 años de edad y árboles de mandarino (*Citrus clementina* cv. Orogrande) de 16 años de edad. Los objetivos del estudio son: i) evaluar la viabilidad de utilización de las AR en cultivos de cítricos, analizando su influencia en el crecimiento y producción, así como, en la calidad y seguridad de las cosechas obtenidas, ii) profundizar en el conocimiento de la respuesta de los cítricos al riego deficitario controlado (RDC), prestando especial atención a un aspecto novedoso en la aplicación de estas estrategias como es el riego con aguas de baja calidad y iii) determinar la eficiencia del uso del agua (EUA) a nivel de planta y sus patrones de extracción en función de los recursos hídricos utilizados y la eficiencia del uso del nitrógeno (EUN) para un manejo óptimo de la fertirrigación mediante técnicas de determinación de isótopos estables (¹³C, ¹⁸O y ¹⁵N).

Palabras clave: Intercambio gaseoso; isótopo estable; mandarino; pomelo; relaciones hídricas.

Abstract

We present an experimental protocol aiming to assess the agronomic and physiological response of citrus to deficit irrigation (RDI) with reclaimed water (RW). It focuses on the impact of RW use on both the plant (physiology, production, quality and safety of the harvest) and the environment (accumulation of salts and nutrient availability), and analyzing, from a holistic point of view, sustainability in the medium to long term. The trials are being conducted in a commercial citrus farm, located northeast of the Region of Murcia. The experimental plot of 1 ha is cultivated with grapefruit trees 'Star Ruby' (*Citrus paradisi* Macf) 8 years of age and mandarin trees (*Citrus clementine* cv. Orogrande) 14 years of age. The objectives are: i) the use of RW in citrus crops and its influence on the growth and production as well as in the quality and safety of crops, ii) deepen the knowledge of Citrus response to deficit irrigation (RDI), paying particular attention to the implementation of these strategies using low quality water and iii) determine the efficiency of water use (WUE) at tree scale and extraction patterns depending on water resources used and nitrogen use efficiency (NUE) for optimal management of fertilizer application to crop, both through techniques of determination of stable isotopes (¹³C, ¹⁸O and ¹⁵N).

Keywords: gas exchange; grapefruit; mandarin; stable isotope; water relations.

1. Introducción

El cítrico es uno de los cultivos leñosos más importantes del mundo, a nivel comercial, incluyendo la zona semiárida mediterránea del sureste español [1]. En esta región, el agua de riego no está siempre disponible dada la escasez de la misma y los cultivos sufren habituales periodos de sequía, principalmente en verano. Por ello, el uso de fuentes de agua no convencionales como son las aguas regeneradas (AR) salinas sería una alternativa, ya que su volumen se está incrementando en los últimos años en España (368 hm³ por año). Dichas AR

tienen ventajas agronómicas como el posible aprovechamiento de sus macronutrientes (N, P, K) como fertilizantes, pero también puede conllevar riesgos, como la salinización secundaria y la degradación del suelo, que dan lugar a impactos negativos en la fisiología de la planta y, por tanto, en el rendimiento [2]. En este sentido, es conocido que los cítricos son sensibles a la salinidad y al déficit hídrico. Los efectos fisiológicos de estos estreses son, entre otros, reducción de la conductancia estomática, g_s [3], la tasa de transpiración, T_r , y la asimilación neta de CO₂, A. La exposición de las plantas a las sales

puede afectar a su metabolismo de dos formas: i) mediante una acumulación de niveles tóxicos de Cl^- y Na^+ en las hojas cuando no hay compartimentación de estos iones en la vacuola y ii) mediante un efecto osmótico, mecanismo que las plantas usan para mantener la turgencia de la hoja sin que haya un importante cierre estomático [4]. Entre los factores ambientales que afectan a la apertura estomática, la disponibilidad de agua en el suelo y el déficit de presión de vapor (DPV) predominan en condiciones de sequía [5].

Por otro lado, la medida de isótopos estables, que integra un periodo de tiempo más amplio, puede ser capaz de explicar adecuadamente los cambios acontecidos en las medidas de intercambio gaseoso. Así, los modelos que explican el enriquecimiento en $\delta^{18}\text{O}$ en la biomasa foliar prevén que disminuya con el aumento de la conductancia estomática, independientemente de la evidencia experimental [6]. En el caso del análisis del isótopo estable $\delta^{13}\text{C}$, éste está íntimamente ligado con la eficiencia del uso del agua en la hoja durante todo el período de formación de la misma. Por tanto, los factores de estrés abiótico como la luz, el agua, la salinidad, etc., van a afectar a la fracción del $\delta^{13}\text{C}$ en la planta. El análisis del isótopo estable $\delta^{15}\text{N}$ nos indica el grado de eficiencia en el uso del nitrógeno de los sistemas agrarios y, además, se puede relacionar positivamente con pérdidas de N, lixiviación y desnitrificación del suelo [7], ya que cuanto mayor es la concentración de $\delta^{15}\text{N}$, más ineficiente es el sistema [8].

El comportamiento del portainjerto frente al déficit hídrico o a la salinidad ha sido descrito en varios trabajos [1], sin embargo, no existen estudios que combinen ambos estreses en condiciones de campo y AR salina a largo plazo. El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto combinado de ambos estreses abióticos sobre la fisiología de la planta (estado hídrico, intercambio gaseoso, producción, calidad de la cosecha, etc.) y el medio ambiente (acumulación de sales y disponibilidad de nutrientes) de dos de los portainjertos más utilizados en el área Mediterránea: *Citrus Macrophylla* y *Carrizo Citrange*.

2. Materiales y Métodos

El ensayo se está realizando en una finca comercial de pomelo (*Citrus paradisi* L. cv 'Star Ruby' sobre patrón *Citrus Macrophylla* de 10 años de edad con marco de plantación de 6 x 4 m) y mandarino (*Citrus clementina* cv.

'Orogrande' sobre patrón Carrizo citrange - *Citrus sinensis* [L.] Osb. x *Poncirus trifoliata* [L.] de 16 años de edad en un marco de plantación de 5 x 3.5 m) que se riegan con dos fuentes de agua de riego: a) procedente del trasvase Tajo-Segura (AT), de buena calidad agronómica (Conductividad eléctrica $\text{CE} \sim 1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) y la segunda procedente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Molina de Segura Norte (AR), caracterizada por generar un efluente altamente salino ($\text{CE} \geq 3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$). Para ambas fuentes de agua y cultivo se han establecido dos tratamientos de riego; un tratamiento de riego control regado para satisfacer los requerimientos hídricos del cultivo (100% de la Evapotranspiración del cultivo, ETc) y otro de riego deficitario controlado (RDC) con idéntica dotación que el control durante todo el año excepto durante la segunda fase de acumulación de solutos y azúcares en el fruto, en la que se riega al 50% de la ETc al objeto de conseguir un déficit hídrico moderado. Los ocho tratamientos resultantes son denominados como: T0 y T6 (Tratamiento Control regado con AT para pomelo y mandarino, respectivamente), T1 y T7 (Tratamiento RDC regado con AT para pomelo y mandarino, respectivamente), T2 y T8 (Tratamiento Control regado con AR para pomelo y mandarino, respectivamente) y T3 y T9 (Tratamiento RDC regado con AR para pomelo y mandarino, respectivamente). La programación del riego es semanal a partir de los cálculos de evapotranspiración de referencia (ETO) Penman-Monteith.

Periódicamente se miden los parámetros de control de la situación hídrica de la planta (potencial hídrico de tallo) con una cámara de presión tipo Scholander y los niveles de intercambio gaseoso a nivel foliar (fotosíntesis neta, A, y la conductancia estomática, g_s) con un equipo portátil de fotosíntesis (LI-6400 Li-Cor, Lincoln, NE, EE.UU) equipado con cámara de fluorescencia, en los árboles centrales de cada repetición de los distintos tratamientos de riego, seleccionando días claros de máxima demanda evaporativa, entre 08:00-10:00 GMT. Se determina el peso seco, el área foliar y el contenido en nitrógeno (Flash EA 112 Series, England and Leco Truspec, Sant Joseph, USA). Además, se analiza el contenido de clorofila total, a y b con un espectrómetro (Thermo Spectronic, England) mediante el método de Inskeep and Bloom. Se realizarán medidas de la dinámica del crecimiento vegetativo, cobertura del dosel, y crecimiento del fruto para todos los tratamientos considerados. Asimismo, se evalúa el estado

nutricional de la planta en los diferentes estados fenológicos mediante análisis foliares.

Al final de cada ciclo de cultivo se evaluará la producción final y la distribución de los calibres de los frutos obtenidos en cada uno de los árboles testigos de cada tratamiento. Se medirán parámetros físicos de calidad de la fruta (firmeza y color) y químicos (pH, sólidos solubles, acidez total).

Para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila se realizarán curvas de respuesta a la luz de las que obtendremos información sobre el rendimiento cuántico máximo aparente (pendiente inicial) y la intensidad de luz de saturación (irradiancia a la cual la fotosíntesis es máxima); y también curvas de respuesta A-Ci, que nos permitirán obtener información sobre la capacidad fotosintética de las hojas. La información de las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la variación de la concentración interna de CO₂ (curvas de respuesta A-Ci) se verá respaldada y completada por la estima de otros parámetros como la medida del transporte electrónico a partir de la fluorescencia de clorofila, actividad del fotosistema I y II, determinación de la tasa de fotorrespiración y de la conductancia del mesófilo.

Se evalúan los valores de eficiencia del uso del agua (EUA) y grado de control estomático y de la transpiración a nivel de planta por medio de la determinación de los isótopos ¹³C y ¹⁸O en tejido foliar. Se determinan los patrones de extracción de agua del suelo por la planta en función de los recursos hídricos aportados (cantidad y calidad), mediante la medida del ¹⁸O en agua extraída del tejido leñoso y a distintas profundidades del suelo muestreado. Para el caso de la medida del $\delta^{18}\text{O}$ en medio líquido, se va a extraer el agua del tejido leñoso y suelo mediante una línea criogénica de extracción al vacío. Por último, con el objetivo de analizar la eficiencia de uso del nitrógeno (EUN) por el cultivo, se determina también el $\delta^{15}\text{N}$ de muestras de suelo y agua aportada en el riego (AT y AR) además de una muestra de los fertilizantes nitrogenados aplicados al cultivo, con objeto de estimar aproximadamente, de la composición isotópica $\delta^{15}\text{N}$ del tejido foliar, la fracción que procede del fertilizante, agua y/o suelo. Todas las medidas de isótopos estables se realizarán en

colaboración con el “Stable Isotope Facility” de la Universidad de California (Davis, EEUU).

3. Resultados y Discusión

La novedad del presente trabajo radica en el planteamiento experimental utilizado, en donde de forma conjunta se evalúan los efectos acumulados de la estrategia de riego y del uso de aguas regeneradas. Aspectos relevantes a destacar:

1. Evaluación de los efectos que tiene la utilización de las aguas regeneradas sobre la producción y calidad de la cosecha a medio largo plazo. Se evaluarán los efectos que la utilización de aguas regeneradas y su combinación con estrategias de RDC tienen en la producción de cítricos y sobre los principales parámetros físico-químicos de las cosechas obtenidas. Con este objetivo, se realizarán también medidas de la situación hídrica de la planta (potencial hídrico de tallo), evolución de los niveles de intercambio gaseoso (conductancia estomática y fotosíntesis) y estudio del estado nutricional del cultivo en los diferentes estados fenológicos (análisis foliar).

2. Evaluación y análisis de la capacidad de asimilación de CO₂ de cítricos en función de las distintas estrategias de riego y calidad de agua empleadas. Se cuantificará el papel de la demanda atmosférica en la limitación a la difusión de CO₂, tanto estomática como del mesófilo, en distintas condiciones de agua en suelo y de calidad de la misma. Esta actividad se abordará a lo largo de todo el proceso experimental, y sus resultados serán de gran relevancia tanto para mejorar la eficiencia en el uso del agua de los cítricos, como para valorar la capacidad de estas plantas como sumidero de CO₂ ambiental.

3. Determinación de la eficiencia en el uso del agua de los cítricos, y de sus patrones de extracción y aprovechamiento de agua y fertilizantes. Para ello, se utilizarán técnicas de determinación de isótopos estables (¹³C, ¹⁸O y ¹⁵N) con el objetivo de determinar la EUA a nivel de planta por medio de la determinación del ¹³C, los patrones de extracción de agua por medio de la determinación del ¹⁸O y la capacidad de absorción de fertilizantes por medio de la determinación del ¹⁵N. Esta actividad pionera permitirá profundizar en la fisiología de las plantas y en la optimización de los procesos de fertirrigación, por medio de la aplicación de

técnicas isotópicas escasamente utilizadas, hasta el momento, en las ciencias agrarias.

4. Conclusiones

El uso de agua regenerada para riego de cítricos es una importante alternativa a considerar, pero es necesario evaluar sus efectos a medio-largo plazo. Por ello, tras ocho años de riego con este tipo de agua, combinada con estrategias de riego deficitario controlado, se pretende conseguir una estimación completa de sus efectos a nivel fisiológico, así como las estrategias de riego adecuadas para evitar posibles riesgos en la sostenibilidad de los cultivos. Además, se pretende demostrar la utilidad de las medidas de discriminación isotópica como indicadores capaces de predecir y evaluar los niveles de eficiencia en el uso del agua y del nitrógeno en el cultivo de pomelo y mandarino.

5. Agradecimientos

Esta investigación se financia por los proyectos SIRRIMED (KBBE-2009-1-2-03, PROPOSAL Nº 245159), SENECA (05665/PI/07 y 11872/PI/09), CONSOLIDER INGENIO 2010 (MEC CSD2006-0067) y CICYT (AGL2013-49047-C2-2-R). Romero-Trigueros agradece el apoyo financiero del programa JAE-CSIC.

6. Referencias bibliográficas

[1] Pérez-Pérez J.G., Robles J.M., Botía P. 2014. Effects of deficit irrigation in different fruit growth stages on 'Star Ruby' grapefruit trees in semi-arid conditions. *Agr Water Manage.* 133:44– 54.

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

[3] Grattan S. 2013. Evaluation of the impact of Boron on citrus orchards in riverside country. *Crop. Salin. Consult.*

[4] Álvarez S., Gomez-Bellot M.J., Castillo M., Banon S., Sanchez-Blanco M.J. 2012. Osmotic and saline effect on growth, water relations, and ion uptake and translocation in *Phlomis purpurea* plants. *Environ Exp Bot.* 78:138-145.

[5] Pantin F., Monnet F., Jannaud D., Costa J.M., Renaud J., Muller B., Simonneau T., Genty B. 2013. The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytol.* 97(1): 65-72.

[6] Sheshshayeea M.S., Bindumadhavaa H.R., Rameshb R., Prasada T.G. and Udayakumara M. 2010. Relationship between $\delta^{18}O$ enrichment in

leaf biomass and stomatal conductance. *Isot Environ Healt S.* 46(1):122–129.

[7] Destain J.P., Fonder N., Xanthoulis D., Reuter V. (2010). Stable N-15 isotope and lysimeter, complementary tools in order to study the nitrogen leaching in agricultural soils. *Biotechno Agron Soc.* 14:91-96.

[8] Kriszan M., Amelung W., Schellberg J., Gebbing T., Kuhbauch W. 2009. Long-term changes of the delta N-15 natural abundance of plants and soil in a temperate grassland. *Plant Soil.* 325:157-169.

Figuras



Figura 1. Diseño experimental de la parcela de pomelo. Los árboles sombreados son los utilizados para la toma de muestras.



Figura 2. Diseño experimental de la parcela de mandarino. Los árboles sombreados son los utilizados para la toma de muestras.



POSTER SESSION IV

Agroforestry
engineering

Subsurface drip irrigation vs. surface drip irrigation in tomato

F.J. Lucas⁽¹⁾, V. Martínez-Álvarez⁽²⁾, M. Valiente⁽³⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 30203 Cartagena, España. E-mail: javier.lucas@agrolucas.es.

⁽²⁾ Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 30203 Cartagena, España.

⁽³⁾ Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria, ETSIAM, Universidad de Castilla-La Mancha. Campus Universitario, 02071 Albacete, España.

Resumen

Las motivaciones de este trabajo se fundamentan en la necesidad de caracterizar y valorar la utilidad de los sistemas de riego localizado subterráneo (RLSub) y la medida en la que estos se ven modulados por el diseño agronómico e hidráulico del sistema, y de forma aún más significativa por la aparición de obstrucciones en los emisores enterrados, y más particularmente las debidas a la intrusión radicular, en este sentido, es muy importante caracterizar las variables que las modulan para asegurar la viabilidad y eficiencia de este sistema de riego. Se pretende estudiar las diferencias en desarrollo y productividad con distintos tipos de sustrato, y distintos tipos de sistema de riego, siendo uno de ellos el RLSub, manejado con diferentes tratamientos del herbicida Trifluralina (TFN). Se evaluará la respuesta del cultivo atendiendo al tipo de sistema de riego empleado en términos de eficiencia en el uso del agua y valorando la respuesta a la aplicación de TFN sobre éstos y sobre la aparición de intrusión radicular de distintos tipos de emisores.

Palabras clave: Productividad; Obstrucción; Emisores; Trifluralina; Caudal

Abstract

The motivations of this paper are based on the need to characterize and assess the utility of subsurface drip irrigation (RLSub) and the extent to which these are modulated by the agronomic and hydraulic system design, and even more significant for the occurrence of clogging in the buried emitter, and more particularly those caused by root intrusion, in this respect, is very important variables that characterize modulated to ensure the viability and efficiency of the irrigation system. It aims to study the differences in development and productivity with different substrate types and different types of irrigation system, one being the RLSub, handled with different treatments of the herbicide Trifluralina (TFN). Crop response by type of irrigation system used, in terms of efficiency in water use and response to the application of TFN on these and on the occurrence of root intrusion of different types of emitters, is evaluated.

Keywords: Productivity, Obstruction, Emitters, Trifluralina, Flow-rate

1. Introducción

Se define el RLSub como la aplicación de agua bajo la superficie del suelo mediante emisores con dosis de descarga en el mismo rango que el riego localizado superficial [1].

Este sistema da lugar a un mayor rendimiento productivo y eficiencia hídrica que otros sistemas convencionales de riego: por surcos o por aspersión. Cuando se compara con sistemas de riego localizado, en riego subterráneo se obtienen mayores producciones en maíz [2], patata [3], tomate [4], espárrago [5], etc. Aunque, en general no se aprecian diferencias demasiado significativas en cuanto a rendimiento, sí en cuanto a una mayor eficiencia en el aprovechamiento de los recursos hídricos y fertilizantes [6, 7, 8, 9].

Pero sin duda, el gran problema y principal limitante del RLSub es el riesgo de obstrucciones y más específicamente las debidas a la intrusión radicular en los emisores [10]. Los principales métodos para controlar la intrusión radicular son barreras mecánicas, adición del herbicida Trifluralina (TFN) inyectada al agua de riego, incorporación de TFN extrusionada en el plástico del emisor, o en el filtro [11]. Y más cercanamente se está trabajando en las características que han de tener los emisores para prevenir la intrusión radicular [12].

La TFN es un herbicida del grupo de las dinitroanilinas que se degrada por fotodescomposición y por acción de microorganismos. La mayoría de los cultivos tienen tolerancia a 0,05 ppm de producto en suelo [13]. Las características que lo han hecho

adecuado para su uso en riego subterráneo, es su inmovilidad en el suelo al quedar retenida por coloides arcillosos y orgánicos, por lo que al ser muy persistente puede encontrarse en los suelos pasados 60 días desde su aplicación, manteniendo su efecto sobre el desarrollo de la raíz afectando principalmente a la elongación radical [13,14]. El conocimiento de las dosis efectivas de control podría, además, evitar problemas medioambientales debido a la contaminación con este tipo de compuestos [15].

Los objetivos del trabajo son conocer las variables que pueden alterar las características de los sistemas de riego localizado subterráneo de forma que se pueda dar lugar a un mayor aprovechamiento de los recursos hídricos y agronómicos de forma que determinen un aumento de los rendimientos productivos. Para ello, se partirá de un análisis inicial de las experiencias, valoraciones y necesidades de distintos agentes involucrados en el diseño, fabricación y manejo de estos sistemas de riego, que determine una visión clara de la actualidad del manejo y de las problemáticas del mismo y a partir de ahí avanzar en la identificación, diseño, análisis y evaluación de estrategias que tengan como fin perfeccionar los procesos de distribución de agua, sales y nutrientes en el bulbo húmedo, y sobre todo, determinar actuaciones eficaces contra la intrusión radicular.

Por tanto, los objetivos de este trabajo son:

- Determinar y comparar en un sistema de riego localizado subterráneo en condiciones de cultivo el comportamiento en cuanto a aprovechamiento de agua, fertilizantes y energía, y su productividad frente a otros sistemas de riego: riego localizado superficial y riego por aspersión.
- Determinar las variables que afectan la expresión de las potencialidades en cultivos bajo riego localizado subterráneo, atendiendo al diseño hidráulico y agronómico de las instalaciones y fundamentalmente a las características de los emisores.
- Determinar las causas, diseños o manejos relacionados con las variaciones (negativas) de caudal en emisores.
- Determinar las características de los emisores y manejos sobre la instalación

que permitan controlar la intrusión radicular en sistemas de riego localizado subterráneo.

2. Materiales y Métodos

Para la consecución de los objetivos expuestos anteriormente se diseñarán ensayos y experimentos que tendrá su punto de partida en una encuesta a fabricantes, diseñadores, comercializadores, instaladores, usuarios y mantenedores de estos sistemas de riego en las zonas de mayor implantación en España de forma que se determinen aspectos que objetivamente deban ser atendidos en este trabajo y que contribuya al conocimiento y desarrollo de este sistema de riego. Además de esta encuesta se proponen las siguientes experiencias:

- Ensayo para caracterizar la eficiencia del uso de agua y productividad en un cultivo de tomate en invernadero en dos sistemas de riego: riego localizado subterráneo con distintos tipos de emisores, dosis de Trifluralina y tipo de suelo, y riego superficial en distinto tipo de suelo.
- Determinación de las causas y nivel de obstrucción de distintos diseños de emisores tras un cultivo de tomate en riego localizado subterráneo. Influencia del tipo de suelo y dosis de Trifluralina inyectada.
- Ensayo para caracterizar la eficiencia del uso de agua y productividad en césped en dos sistemas de riego: riego localizado subterráneo con distintos tipos de emisores y dosis de Trifluralina, y riego por aspersión.
- Determinación de las causas y nivel de obstrucción de distintos tipos de emisores tras un cultivo de césped en riego localizado subterráneo. Influencia de la dosis de Trifluralina inyectada.
- Determinación de la concentración de Trifluralina que determina la reducción del crecimiento en raíces de tomate en cultivo hidropónico. Diseño de un método no destructivo para medir el desarrollo radicular en plantas cultivadas en hidroponía con el empleo del sistema de análisis de imagen WinRhizo®.
- Realizar una encuesta final a los mismos agentes que la encuesta de inicio una vez comunicadas las

conclusiones del trabajo y valorar si estas suponen un avance en el manejo de los sistemas de RLSUB.

3. Resultados Esperados

Los resultados obtenidos de este trabajo deberán clarificar tres aspectos fundamentales: la mejora del aprovechamiento de recursos de este sistema de riego frente a otros convencionales en diferentes medios de cultivo, la mejora de los rendimientos de los cultivos bajo este sistema de riego frente a otros sistemas de riego convencionales en diferentes medios de cultivo, y los aspectos que determinan y asegura la obtención de estas potencialidades con los sistemas de RLSUB frente a los convencionales, en particular el manejo de la intrusión radicular como la limitante más importante.

Así, se deberá obtener una valoración de los incrementos de eficiencia y aprovechamiento en el uso de agua, fertilizantes y energía de los sistemas de RLSUB frente a otros sistemas de riego y los incrementos productivos y de desarrollo que confiere a los cultivos que se ensayarán. Estos datos deberán reflejar el comportamiento de diferentes cultivos manejados en diferentes medios de cultivo

Del mismo modo se generará un diseño tipo para los sistemas de RLSUB de forma que éstos expresen todo su potencial en los cultivos en los que se instalan. En este sentido será muy importante concluir qué tipo de emisores y qué características y diseño deben tener para que puedan ser empleados de forma segura y eficiente en instalaciones de RLSUB, determinando las características que significan una mayor sensibilidad a la aparición de obstrucciones, sobre todo las debidas a la intrusión radicular.

Y en particular en lo referente a la obstrucción de emisores debido a la intrusión radicular se concluirá una dosis efectiva de TFN y su manejo para que su aplicación determine la prevención de la intrusión radicular sin causar ningún efecto negativo.

Y por último, comunicar las conclusiones obtenidas a los agentes involucrados en el diseño, fabricación y manejo de este sistema de riego localizado para extender el valor que este sistema de riego pueda generar.

4. Conclusiones

Las conclusiones deberán determinar si este sistema de riego es más eficiente y da lugar a mayores producciones que otros sistemas de riego convencionales, en qué medida, y qué elementos y manejos deben introducirse para asegurar el incremento en eficiencia y productividad.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto de investigación "Desarrollo técnico y agronómico del riego localizado subterráneo como alternativa para aumentar la eficiencia hídrica en diferentes sistemas agrícolas. 480/02PA" firmado entre la Universidad Politécnica de Cartagena (Grupo de Investigación "Agroquímica, Tecnología y manejo de Suelos y Sustratos" del Departamento Ciencia y Tecnología Agraria) y la empresa Sistema Azud S. A.

6. Referencias bibliográficas

- [1] ASAE. 1996. Standards. 43rd Ed. S526.1. Soil and water terminology. Ed: ASAE. St. Joseph, Michigan.
- [2] Bar-Yosef B., Sagiv B., Markovitch T. 1989. Sweet corn response to surface and subsurface trickle phosphorus fertigation. *Agron. J.* 81(3): 443-447.
- [3] Sammis I.W. 1980. Comparison of sprinkler, triple, subsurface, and furrow irrigation methods for row crops. *Agron. J.* 72(5): 701-704.
- [4] Phene C.J., Davis K.R., Hutmacher R.B., McCormick R.L. 1987. Advantages of subsurface irrigation for processing tomatoes. *Acta Hort.* 200: 101-115.
- [5] Sterrett S.B., Ross B.B., Savege Jr C.P. 1990. Establishment and yield of asparagus as influenced by planting and irrigation method. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115(1): 29-33.
- [6] Phene C.J., Davis K.R., Hutmacher R.B., McCormick R.L. 1990. Water-fertilizer management of processing tomatoes. *Acta Hort.* 277: 137-143.
- [7] Sánchez C.C. 1996. Riego por goteo subterráneo en olivar, *Vip Underground. Fruticultura Profesional* 77: 18-32.
- [8] Lamm F.R., Trooien T.P., Manges H.L., Sunderman H.D. 2001. Nitrogen fertilization for subsurface drip-irrigated corn. *Trans. ASAE* 44: 533-542.

- [9] Lamm F.R., Trooien T.P. 2003. Subsurface drip irrigation for corn production: a review of 10 years of research in Kansas. *Irrig. Sci.* 22: 195-200.
- [10] Faria L.F. 2002. Variação de vazão de gotejadores enterrados na irrigação de citros e café. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- [11] Ruskin R. 1990. Factors in design, installation and operation of a subsurface drip irrigation system for permanent crops. http://www.geoflow.com/ag_design.html
- [12] Souza W.J., Rodrigues Sinobas L., Sánchez R., Botrel T.A., Duarte, R. 2014. Prototype emitter for use in subsurface drip irrigation: Manufacturing, hydraulic evaluation and experimental analyses. *Biosyst. Eng.* 128: 41-51
- [13] Ruskin R., Van Boris P., Cataldo D.A. 1990. Root intrusion protection of buried drip irrigation devices with slow-release herbicides. En: *Proc. 3rd Nat. Irrigation Symp.* Ed: ASAE. St Joseph, Michigan. Pág: 211-216.
- [14] Anthony R.G., Hussey P.J. 1999. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. *Trends Plant Sci.* 4: 112-116.
- [15] Wang S., Arnold W.A. 2003. Abiotic reduction of dinitroaniline herbicides. *Water Res.* 37: 4191-4201.

Proceedings of the 4th WORKSHOP ON AGRI-FOOD RESEARCH



**Escuela Técnica
Superior de
Ingeniería
Agronómica**



Advanced Techniques in Food and Agricultural Research and
Development – Doctorate Program