Sumario

Producción Animal

Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales
Food restriction in sheep: endocrine-metabolic response according to the level of body reserves
A. Fernández-Foren, J.A. Abecia, M.I. Vázquez, F. Forcada, I. Sartore, M. Carriquiry, A. Meikle y C. Sosa 257

Estudio de la neosporosis en muestras de leche de tanque e individuales y su relación con factores de manejo de la explotación y de calidad de la leche
Study of neosporosis in bulk tank and individual milk samples and their relationship with farm management and milk quality
C. Nogareda, R. Colomé, M. Navarro, R. Armengol y A. Jubert 272

Producción Vegetal

Optimización de la fertilización orgánica a través de niveles críticos de fósforo, potasio y materia orgánica en suelos de huertos intensivos
Optimization of the organic fertilization through critical levels of phosphorus, potassium and organic matter in intensive orchards soils
R. Caballero, M. Vento, P. Chaveli, I. Corrales, P. López, D. Rodríguez y L. Fase 281

Efecto del tratamiento de semillas con láser de baja potencia, sobre el crecimiento y rendimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)
*Efect of seed treatment with low potency laser on the growth and yield in tomato plants (*Solanum lycopersicum *L.)*
A. Álvarez, R. Ramírez, L. Chávez, Y. Camejo, L. Licea, E. Porras y B. García 290

Implicación comercial e industrial de la variabilidad del contenido en aceite y proteína y de los caracteres físicos del fruto y de la pepita del almendro en las condiciones climáticas mediterráneas
Commercial and industrial implication of the variability of oil and protein content and of the nut and kernel physical traits of almond in Mediterranean climates
O. Kodad, A. Mamouni, M. Lahlo y R. Socias i Company 300

Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados in vitro
Factors affecting shoot tip necrosis of Pistacia vera *L. shoots cultured in vitro*
E. García, P. Lorente, J.A. Marín, P. Andreu y A. Arbeloa 315

Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales

A. Fernández-Foren*, J.A. Abecia**, M.I. Vázquez**, F. Forcada**, I. Sartore*, M. Carriquiry***, A. Meikle* y C. Sosa**[1]

[1] Autor para correspondencia: Cecilia Sosa. E-mail: cecis@unizar.es

* Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, UdelaR, C/ Lasplaces 1550, Montevideo 11600, Uruguay

** Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, España

*** Producción Animal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Av. Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay

Resumen

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado corporal podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado "memoria metabólica". El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta endocrino-metabólica a una restricción alimenticia en ovejas con diferente condición corporal (CC) al inicio del experimento. Durante la estación reproductiva, 36 ovejas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC: CC > 2,75 (moderadamente alta, A, 2,9 ± 0,04) y CC < 2,25 (moderadamente baja, B, 2,1 ± 0,04). Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento de energía y proteína, tras lo cual se asignaron al azar a dos tratamientos nutricionales: 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos de mantenimiento diario, estableciéndose cuatro grupos: altas control (AC, n = 9), altas subnutridas (AS, n = 10), bajas control (BC, n = 9) y bajas subnutridas (BS, n = 8). Se determinó el peso vivo (PV) y los niveles plasmáticos de glucosa, ácidos grasos no esterificados (AGNE), ß-hidroxibutirato (BHB), insulina, leptina y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). Los grupos BS y AS perdieron peso, el grupo BC lo ganó y las ovejas AC lo mantuvieron. La concentración plasmática de glucosa fue mayor y los AGNE menor en las ovejas controles. Las ovejas de alta CC presentaron mayores concentraciones de insulina y de IGF-I, y la leptina tendió a ser mayor en estos animales. A su vez, la insulina fue mayor en los animales controles, mientras que las otras hormonas no fueron afectadas por el tratamiento. Los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I estuvieron afectados por la CC inicial y el tratamiento nutricional, como así lo demuestra la interacción significativa entre estos factores y días. Se evidenció un aumento en el momento del celo de las concentraciones de los metabolitos (glucosa y BHB) y de las hormonas metabólicas (insulina e IGF-I). En conclusión, en este estudio se encontró que los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I varían de forma diferente frente a una restricción alimenticia en función del grado de reservas corporales de las ovejas en el momento de iniciarse la restricción alimenticia.

Palabras clave: condición corporal, subnutrición, metabolitos, hormonas, ovejas.

Abstract

Food restriction in sheep: endocrine-metabolic response according to the level of body reserves

The metabolic responses to changes in metabolic status could depend on recent (feeding level) or more ancient (body reserves) metabolic history, a concept termed "metabolic memory". The aim of this work was to study the metabolic response to food restriction in ewes with different body condition score at the

beginning of the experiment (CCi). During the breeding season, 36 Rasa Aragonesa ewes were divided into 2 groups with different BCS: BCS > 2.75 (fat ewes, A, mean ± standard error: 2.9 ± 0.04) and BCS < 2.25 (lean ewes, B, 2.1 ± 0.04). During 20 days, both groups received a diet to supply energy and protein maintain requirements, each group was divided into 2 groups and were fed to provide either 1.5 or 0.5 times the daily maintenance requirements; therefore, the 4 groups were: fat control (AC, n = 9), fat undernourished (AS, n = 10), lean control (BC, n = 9) and lean undernourished (BS, n = 8) ewes. Body weight (BW), glucose, non-esterified fatty acids (NEFA), ß-hydroxybutyrate (BHB), insulin, leptin, and insulin-like growth factor (IGF-I) were determined. BS and AS groups lost weight, BC group gained weight, and AC ewes maintained their BW. Plasma glucose concentration and insulin were higher and NEFA was lower in control ewes. Ewes with high BCS had higher concentrations of insulin and IGF-I, and leptin tended to be higher in these animals. Insulin concentrations were higher in control ewes, while other hormones remained unchanged. Glucose, BHB, insulin and IGF-I profiles were affected by initial BCS and nutritional treatment, as is demonstrated by the significant interaction between these factors and days. Metabolites (glucose and BHB) and metabolic hormones (insulin and IGF-I) concentrations showed a peak at estrus time. In conclusion, it was found that glucose, BHB, insulin and IGF-I profiles respond to undernutrition according to the level of body reserves of the animals at the onset of the nutritional restriction.

Key words: body reserves, undernutrition, metabolites, hormones, sheep.

Introducción

La nutrición es uno de los factores más importantes que afectan el ciclo reproductivo de los rumiantes, por lo que es clave cubrir los requerimientos de los animales a los efectos de optimizar su rendimiento productivo (Martin *et al.*, 2004). En países de clima templado, donde los animales pastorean pastos naturales durante todo el año, las variaciones estacionales en la cantidad y calidad de los pastos modifican las ganancias de peso a lo largo del año (Quintans, 2008) lo que se ha asociado a la eficiencia reproductiva global (Quintans y Roing, 2008).

Para lograr mantener el equilibrio del medio interno y las funciones vitales durante una subnutrición, se dan numerosos cambios en las concentraciones hormonales y en su sensibilidad tisular (Chilliard *et al.*, 1998). Los períodos de balance energético negativo (BEN) están caracterizados por la movilización grasa que se refleja en un aumento de la concentración circulante de ácidos grasos no esterificados (AGNE) (Pedron *et al.*, 1993; Ingvartsen y Andersen, 2000; Burke y Roche, 2007), que a menudo se acompaña con el incremento en la producción de cuerpos cetónicos, como el ß-hidroxibutirato (BHB) (Whitaker *et al.*, 1999). También, durante el BEN, ocurre una redistribución y utilización diferencial de nutrientes, por lo que los tejidos periféricos pueden utilizar otros nutrientes en lugar de la glucosa, permitiendo así una mayor disponibilidad de glucosa en los tejidos periféricos para otras funciones vitales (Bell y Bauman, 1997).

La hormona del crecimiento (GH), juega un papel clave en la subnutrición regulando la utilización de glucosa (Renaville *et al.*, 2002; Flint *et al.*, 2003). Muchos de los efectos somatogénicos de esta hormona están mediados por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) (Breier, 1999; Renaville *et al.*, 2002). El IGF-I es secretado por el hígado en respuesta a la GH y ejerce a su vez un control negativo a nivel hipotálamo-hipófisis para la secreción de GH. En períodos de subnutrición, existe un desacoplamiento hepático en el eje GH–IGF-I, es decir, el hígado es menos sensible a la GH (menor contenido del receptor de GH), resultando en

una reducción de la concentración circulante de IGF-I (Thissen *et al.*, 1994; Chilliard *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999). Esto repercute en varios órganos y tejidos, ya que el IGF-I es anabólico y estimula el crecimiento, pero se destaca además que la falta de retroalimentación negativa sobre la GH, promueve una mayor concentración circulante de esta hormona y por lo tanto, una mayor acción teleoforética (Meikle *et al.*, 2010).

Si bien se considera que el desacoplamiento del eje somatotropo en períodos de subnutrición es una estrategia del rumiante para enfrentar la crisis energética, existen otras señales hormonales que tienen un papel clave. La insulina, secretada por el páncreas, tiene múltiples efectos en el metabolismo; entre los más importantes está el facilitar la entrada de glucosa a las células desde la circulación general y estimular el almacenamiento de lípidos (Bell, 1995; Etherton, 2004). En períodos de subnutrición la concentración de insulina disminuye, y por lo tanto, la estimulación del anabolismo está disminuida. Simultáneamente, la GH aumenta la lipólisis y disminuye los eventos regulados por la insulina, como son el transporte de la glucosa y la lipogénesis (Flint *et al.*, 2003).

Hace aproximadamente una década, se modificó el concepto de que el tejido adiposo es meramente un depósito de reservas y un receptor de señales hormonales que regulan su función. La detección por primera vez en rumiantes de la leptina, hormona proteica secretada principalmente por el tejido adiposo (Delavaud *et al.*, 2000), puso de manifiesto el importante papel endocrino de este tejido. La leptina es uno de los principales agentes que informan sobre el nivel de almacenamiento de energía periférica a regiones cerebrales que controlan el apetito, el metabolismo y la función endocrina para mantener la homeostasis (Chilliard *et al.*, 1998). La subnutrición disminuye la concentración circulante de leptina (Sosa *et al.*, 2006; 2009), y frente a una sobrealimentación en el ganado vacuno y ovino, ésta aumenta en sangre (Chilliard *et al.*, 2000), lo que sugiere que es una señal para las adaptaciones endocrinas, metabólicas y de comportamiento dirigidas a restaurar la homeostasis (Chilliard *et al.*, 2000; 2001). También se ha sugerido que la leptina regula directamente la función hepática (Yasari *et al.*, 2009), pudiéndose proponer un mecanismo de comunicación entre estos dos principales tejidos metabólicos (hígado y tejido adiposo).

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado metabólico podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado "memoria metabólica" (Chilliard *et al.*, 2005; Blache *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el impacto de la subnutrición varía de acuerdo con el estado fisiológico del animal y de acuerdo con su condición corporal (Blanc *et al.*, 2006). En trabajos previos (Sosa *et al.*, 2006; 2009) hemos encontrado respuestas endocrino-metabólicas diferenciales frente a una misma restricción alimenticia; estos experimentos, que no se realizaron simultáneamente, se realizaron con animales de la misma raza, pero con una condición corporal (CC) de partida diferente (0.6 puntos de diferencia en una escala de 0 a 5; Russel *et al.*, 1969).

Por lo tanto, la hipótesis del presente trabajo fue que las respuestas metabólicas y endocrinas frente a un tratamiento de subnutrición agudo (efecto dinámico) podrían depender de las reservas energéticas corporales iniciales (CCi, efecto estático). El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta metabólica –en términos de metabolitos y hormonas– a una restricción alimenticia en ovejas con diferente CC al inicio del experimento.

Materiales y métodos

Animales y tratamientos

Este experimento se llevó a cabo en la granja experimental de la Universidad de Zaragoza, España (latitud 41°41' N), bajo la supervisión del Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza y de acuerdo a las exigencias de la Unión Europea para la experimentación animal. Durante la estación reproductiva (Diciembre-Marzo), 36 ovejas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC (CC inicial, CCi) (CC, escala de 0 a 5; Russel *et al.*, 1969): CCi > 2,75 (n=19, moderadamente alta, **A**) y CCi < 2,25 (n=17, moderadamente baja, **B**). El peso vivo (PV) al inicio del experimento fue de 61,9 ± 1,6 kg y 50,9 ± 1,7 kg para el grupo A y B, respectivamente; y la CCi fue de 2,9 ± 0,04 para el grupo A y 2,1 ± 0,04 para el B. Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento en energía y proteína (AFRC, 1993). Las dietas consistieron en: 0,45 kg de materia fresca (MF) de concentrado (pienso) y 0,55 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo A, y en 0,40 kg MF de concentrado y 0,50 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo B. Ambas dietas proporcionaron 2 Mcal EM/kg MF y 9% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja, en una relación porcentual de 85:15. Tras este período, cada grupo fue dividido en 2 grupos que fueron alimentados para proporcionar 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos diarios de mantenimiento de acuerdo a nuestros trabajos previos (Abecia et al., 1993; 1995; Lozano et al., 1998; Sosa et al., 2006). Las dietas consistieron en 0,60 kg (MF) de pienso y 0,9 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 1,5M (grupo C) y 0,20 kg MF de pienso y 0,30 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 0,5 M (grupo S). Ambas dietas proporcionaron 2,1 Mcal EM/kg MF y 11% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja en una relación de 66:34. Por lo tanto, los 4 grupos experimentales fueron: ovejas altas control (AC, n = 9), ovejas altas subnutridas (AS, n = 10), ovejas bajas control (BC, n = 9) y ovejas bajas subnutridas (BS, n = 8). Al comienzo del tratamiento con las diferentes dietas, todas las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas de progestágeno (acetato de fluorogestona, 40 mg; ISPAH, Salamanca, España) durante 14 días. Al momento de la retirada de las esponjas, las ovejas fueron inyectadas i.m. con 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (Sincropart® PMSG, Ceva Salud Animal, Barcelona, España) y el estro (Día 0) se detectó cada 8 horas a partir de las 24 horas de retiradas las esponjas, usando moruecos vasectomizados. El día 5 después del celo, los animales de cada grupo fueron sacrificados para realizar otros estudios. El PV fue determinado los días -35, -21, -15 (inserción de esponjas e inicio de dietas diferenciales), -1 (retiro de esponjas) y 5 (sacrificio), con respecto al estro.

Muestreos sanguíneos

Las muestras de sangre se extrajeron cada 3 días en tubos de vacío con heparina de la vena yugular de animales en ayuno, desde el día anterior del comienzo de las dietas diferenciales (día -16) hasta el final del experimento. El plasma fue separado por centrifugación a 1000g por 10 minutos y almacenado a -20ºC hasta la posterior determinación de hormonas y metabolitos.

Determinaciones analíticas

Las concentraciones de glucosa y BHB se determinaron usando un analizador automático (Gernonstar®, Transasia, Bombay, India). Para la determinación de glucosa se utilizó un kit enzimático (Gernon®, RAL for Laboratorios Techniques, Barcelona, España) y los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron 2,2% y 3,1%, respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 1 mg/dL. La

concentración de BHB también se determinó utilizando kits comerciales (RANBUT®, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido) y su sensibilidad fue de 0,1 mmol/L. Los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron menores del 6%. Los AGNE fueron cuantificados utilizando el kit NEFA-HR (2) (Wako Chemicals, Richmond, Estados Unidos) con el volumen de muestra y reactivos ajustados para una placa de 96 pocillos (Multiskan EX; Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). La sensibilidad del ensayo fue de 0,01 mmol/L y el CV intra-ensayo fue 12,5%.

Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de insulina fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, Estados Unidos). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 2,2 mUI/mL. Los CV intraensayo para controles bajos (2,2mUI/mL) y medios (12,6 mUI/mL) fueron 8,2 y 9,4%, respectivamente. El IGF-I fue determinado usando un ensayo inmuno-radiométrico de un kit comercial (IGF1-RIACT CisBio International, GIF-SR-YVETTE CEDEX, Francia), previamente comunicado por (Adrien *et al.,* 2011). La sensibilidad del ensayo fue de 0,7 ng/mL. Los CV intra-ensayo para el control 1 (43,8 ng/mL) y el control 2 (521,5 ng/mL) fueron de 8,2 y 7,9%. La concentración de leptina se determinó por un RIA en fase líquida usando un kit comercial Multi-Species Leptin (Millipore, Cat XL-85K) previamente comunicado en bovinos (Pinotti y Rosi, 2006). La sensibilidad fue de 1,8 ng/mL. Los CV intra-ensayo para el control 1 (5,3 ng/mL) y el control 2 (18,3 ng/mL) fueron 5,6 y 5,1%, respectivamente.

Análisis estadísticos

Todas las variables fueron analizadas por un ANOVA utilizando un procedimiento mixto de medidas repetidas. El modelo incluyó los efectos fijos de CC inicial (moderadamente alta o moderadamente baja), tratamiento nutricional (control o subnutrición), días y sus interacciones y la estructura de covarianza autorregresiva de primer orden. Se utilizó el procedimiento Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador. La separación de medias se realizó por el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos). Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados ± errores estándares combinados. Las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$, y tendencia cuando $0,05 < P < 0,10$.

Resultados

Peso Vivo

Desde el comienzo del experimento hasta el día -15 (comienzo del tratamiento nutricional), el PV fue menor en las ovejas de baja CC en comparación con las de alta CC (Figura 1). Desde el día -15 hasta el día 5, las ovejas BS y AS perdieron peso vivo (6 y 7,3 kg, respectivamente; $P < 0,05$), mientras que el grupo BC ganó 5,8 kg ($P < 0,05$) y las ovejas AC mantuvieron su PV (Figura 1).

Metabolitos

La triple interacción entre CCi, tratamiento nutricional y día tendió a afectar las concentraciones de glucosa ($P = 0,08$). Los grupos subnutridos disminuyeron en un 10% la concentración de glucosa en el primer muestreo después de iniciada la subnutrición (66 vs 58,7 mg/dL; $P < 0,05$). Los niveles se mantuvieron bajos excepto por el aumento pronunciado de glucosa observado un día antes del estro (día-1) en todos los grupos exceptuando las BS, seguido por una disminución hasta el día 2 para todos los grupos (Figura 2). En general,

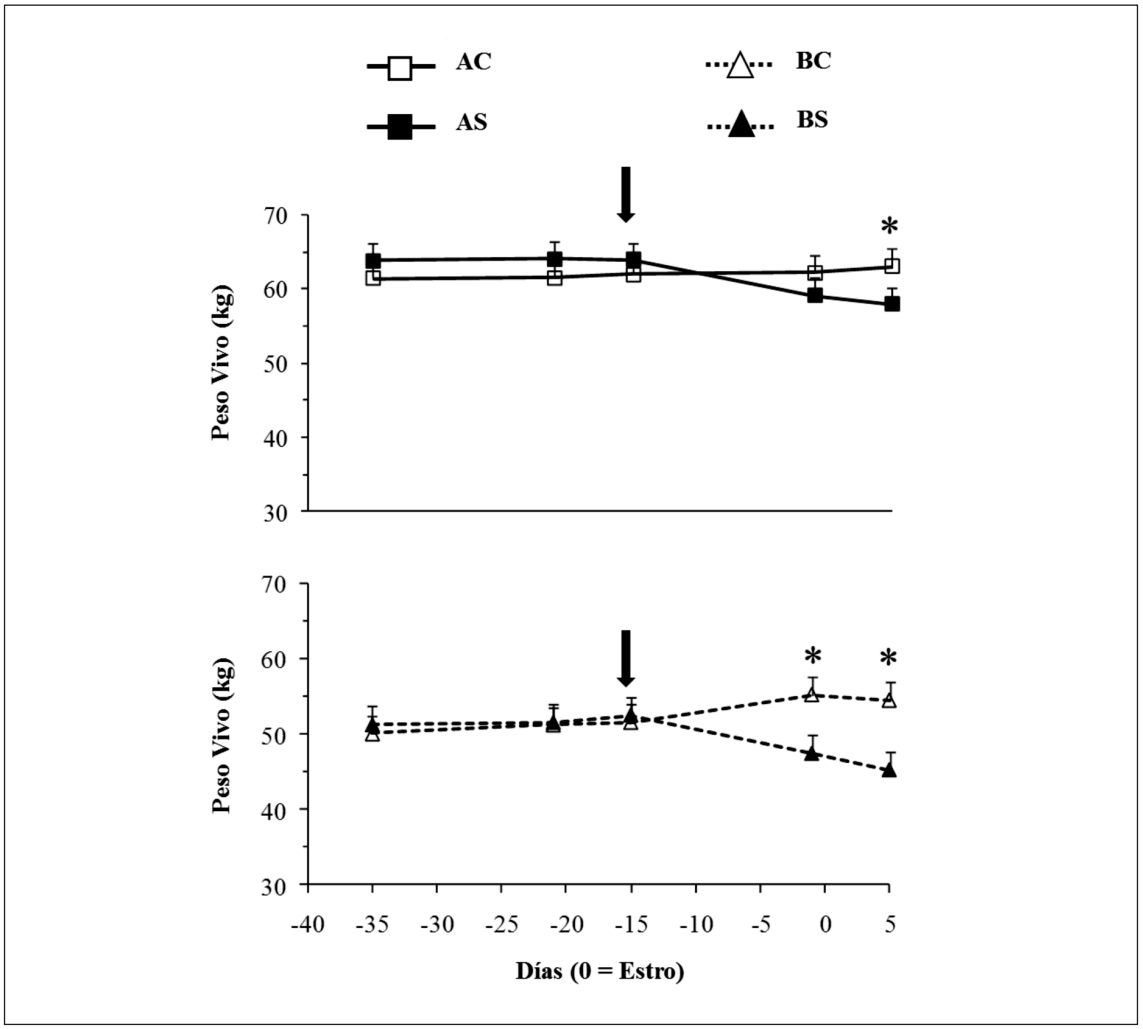


Figura 1. Peso vivo a lo largo del experimento en ovejas con una CCi moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición.
Figure 1. Body weight of fat (A) and lean (B) sheep fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance. The black arrow indicates the moment where undernutrition started.

las concentraciones de glucosa fueron mayores en los grupos control respecto de los subnutridos (Tabla 1); evidenciándose este efecto en determinados días durante el experimento (Figura 2). No hubo efecto de la CCi ni de su interacción con el tratamiento nutricional.

Las ovejas subnutridas presentaron concentraciones de AGNE superiores a las ovejas controles ($P < 0,05$), independientemente de su CCi (Tabla 1). No hubo efecto de la CCi ni de su interacción con el tratamiento nutricional. Se observó una interacción entre tratamiento

Tabla 1. Concentraciones de metabolitos y hormonas en ovejas con alta (A) y baja (B) CCi alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento
Table 1. Concentrations of metabolites and hormones in fat (A) and lean (B) ewes fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance

	CCi		Tratamiento nutricional	
	A	B	C	S
Glucosa (mg/dL)	61,4 ± 1,0	62,7 ± 1,1	63,8 ± 1,0^{a}	60,3 ± 1,0^{b}
AGNE (mmol/L)	0,54 ± 0,05	0,58 ± 0,06	0,36 ± 0,05^{a}	0,76 ± 0,05^{b}
BHB (mmol/L)	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Insulina (μUI/mL)	4,84 ± 0,38^{a}	3,49 ± 0,40^{b}	4,64 ± 0,39^{x}	3,70 ± 0,39^{y}
Leptina (ng/mL)	2,94 ± 0,19^{x}	2,49 ± 0,21^{y}	2,78 ± 0,19	2,65 ± 0,20
IGF-I (ng/mL)	395,2 ± 28,4^{a}	261,6 ± 30,0^{b}	333,6 ± 29,2	323,3 ± 29,3

Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas: ^{a,b} P < 0,05; ^{xy} 0,05 < P < 0,10.
Different superscripts in the same row indicate statistical differences: ^{a,b} P < 0.05; ^{xy} 0.05 < P < 0.10.

nutricional y día de muestreo en las concentraciones de AGNE (P < 0,01). Seis días después de iniciada la subnutrición las concentraciones de AGNE aumentaron en las ovejas AS (P < 0,05), mientras que en las BS el aumento ocurrió en el primer muestreo post tratamiento. Mientras que las AS mantuvieron concentraciones de AGNE estables, con un aumento el último día de muestreo, las BS presentaron fluctuaciones importantes (Figura 2).

Los perfiles de BHB no se vieron afectados por el tratamiento nutricional, la CCi ni la interacción entre ambas variables. Sí se observó una tendencia a ser afectados por la triple interacción entre CCi, el tratamiento nutricional y el día de muestreo (P = 0,06) dada fundamentalmente por diferencias en días puntuales. Las ovejas AS presentaron mayor concentración de BHB que el grupo AC ocho días después de iniciado el tratamiento nutricional (P < 0,05; Figura 2), mientras que esta diferencia no se observó en las ovejas de baja CCi. Por otro lado, en las BS se observó mayor concentración de BHB un día antes del estro que en las BC (P < 0,05). Se observó un aumento en las concentraciones de BHB un día antes del estro (día-1) en todos los grupos (P < 0,05), excepto el BC (Figura 2).

Hormonas

Las ovejas de alta CCi presentaron mayor concentración de insulina en comparación con las ovejas de baja CCi (P < 0,05), así como las ovejas con una dieta de mantenimiento tendieron a tener mayores concentraciones de insulina que las subnutridas (P < 0,09; Tabla 1). Las concentraciones de insulina se vieron afectadas por la triple interacción entre CCi, tratamiento nutricional y día (P < 0,05): las ovejas con alta CCi mantuvieron niveles de insulina altos hasta el estro, el grupo AC mostró un aumento marcado al estro, y tras ese día ambos grupos disminuyeron (Figura 3). Por otro lado, en las ovejas con baja CCi se observó un claro efecto de la subnutrición, disminuyendo las concentraciones que se mantuvieron bajas hasta el final del ensayo. En el grupo BC los niveles se mantuvieron estables y no se observaron aumentos alrededor del estro (Figura 3).

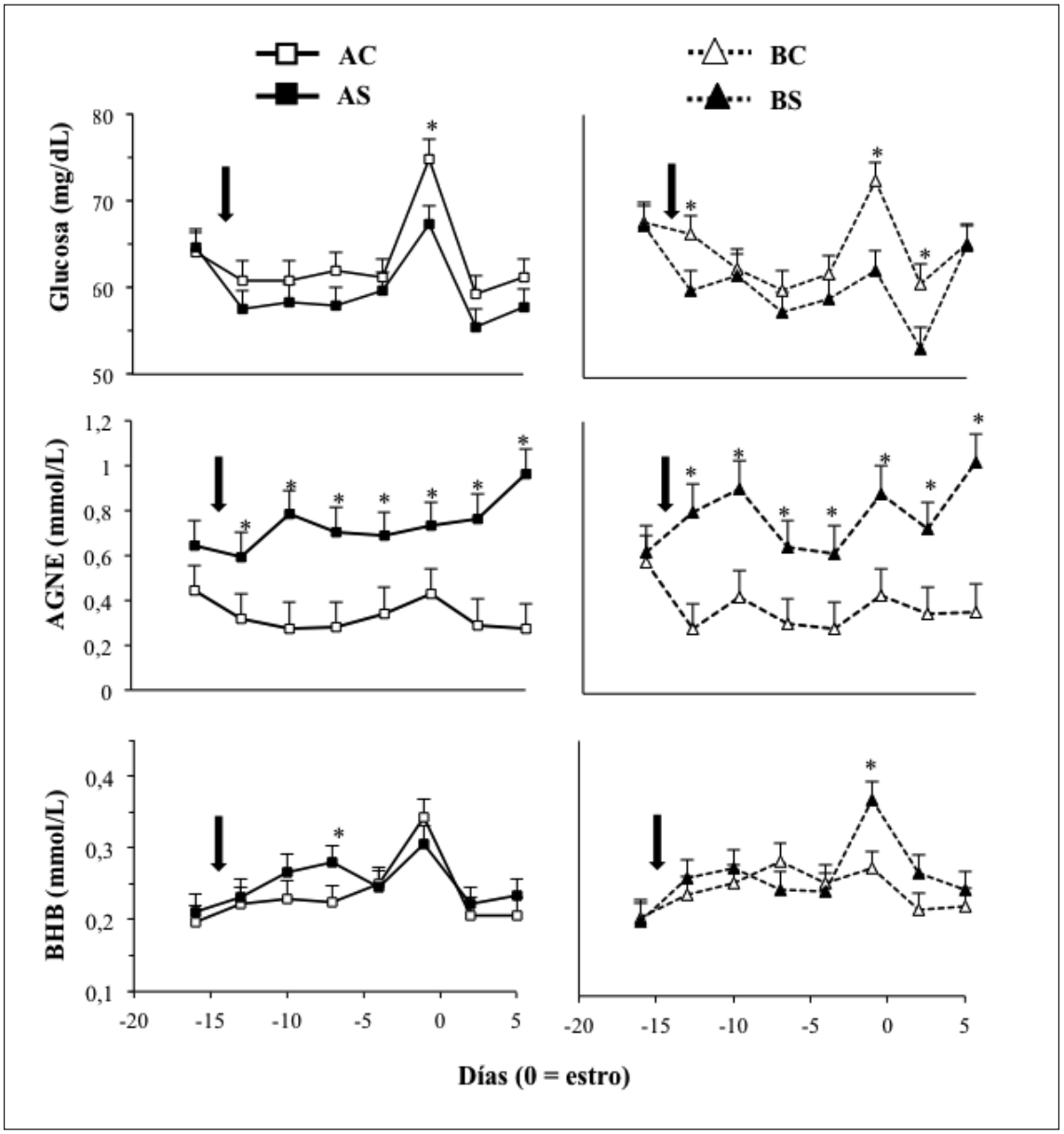


Figura 2. Concentración plasmática de glucosa, AGNE y BHB en ovejas con una CCi moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimiento de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, P < 0,05.

Figure 2. Plasma concentrations of glucose, AGNE and BHB of fat (A) and lean (B) sheep fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance. The black arrow indicates the moment where undernutrition started. Asterisks indicate differences between groups, P < 0.05.

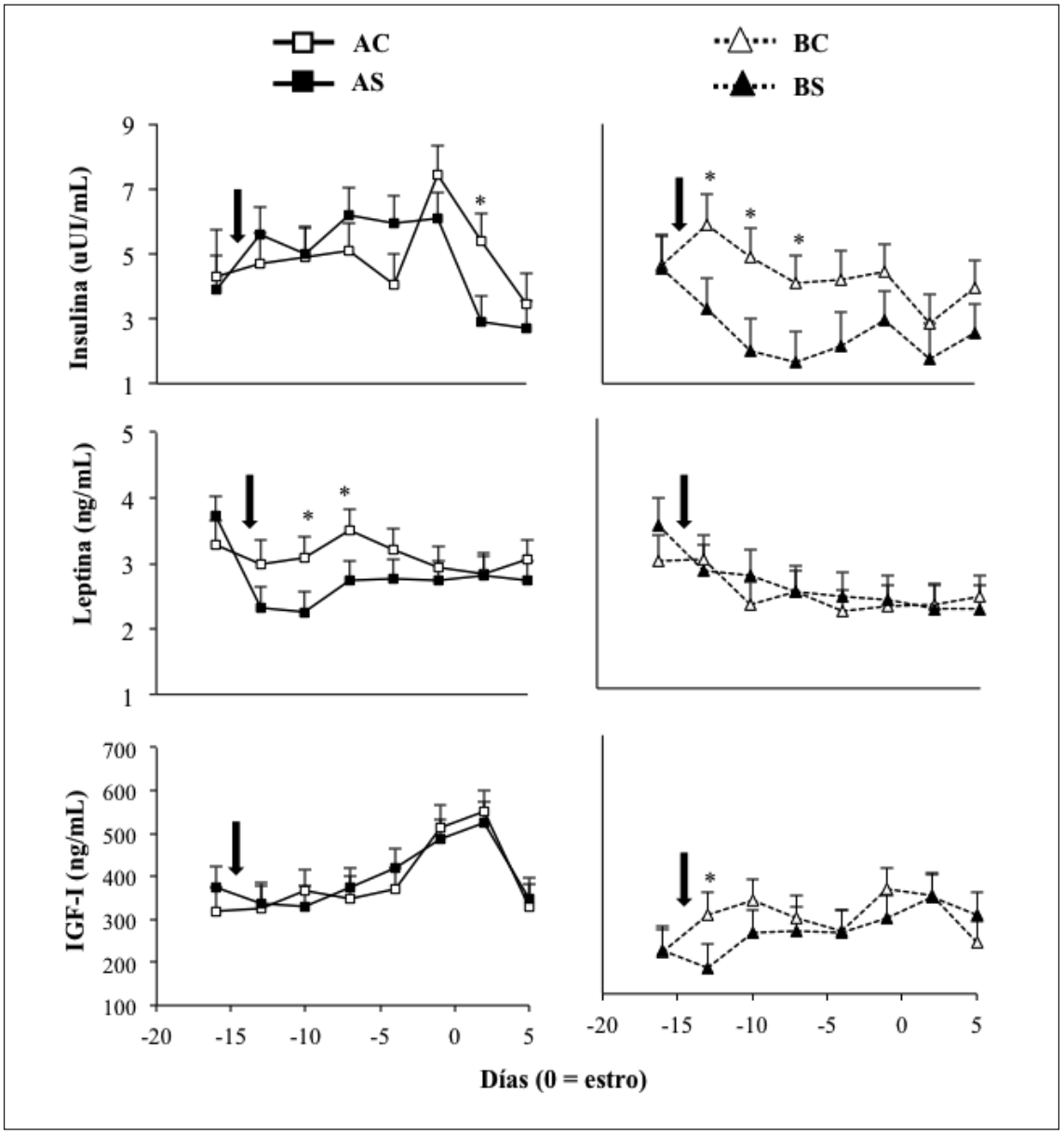


Figura 3. Concentración plasmática de insulina, leptina e IGF-I en ovejas con una CCi moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimiento de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, P < 0,05.

Figure 3. Plasma concentrations of insulin, leptin and IGF-I of fat (A) and lean (B) sheep fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance. The black arrow indicates the moment where undernutrition started. Asterisks indicate differences between groups, P < 0.05.

Las concentraciones de IGF-I fueron mayores en las ovejas con alta CCi que en las de baja CCi (P < 0,01; Tabla 1). No se observó efecto del tratamiento nutricional ni de su interacción con la CCi. Las concentraciones de IGF-I tendieron a estar afectadas por la triple interacción entre CCi, tratamiento nutricional y día (P = 0,07). Las concentraciones a lo largo del tiempo tendieron a ser diferentes entre los distintos grupos: no se encontraron diferencias entre las ovejas con alta CCi, subnutridas o control, los niveles aumentaron alrededor del estro y disminuyeron posteriormente; mientras que se observó un aumento en las concentraciones de IGF-I en las BC con respecto a las BS en el primer muestreo post-tratamiento y los niveles volvieron aumentar alrededor del estro. De forma similar a la glucosa, se detectó un aumento (P < 0,05) de IGF-I alrededor del estro en todos los grupos exceptuando las BS, seguido por una disminución hasta el día 5 (Figura 3).

Las ovejas con alta CCi tendieron a presentar mayores concentraciones de leptina que las de baja CCi (P = 0,1; Tabla 1). No se observó efecto del tratamiento nutricional ni de su interacción con la CCi. La triple interacción día x tratamiento x CCi no fue significativa, a pesar de que se observaron diferencias puntuales. El grupo AC presentó mayores concentraciones de leptina que el grupo AS entre los días -10 y -7 del ciclo (P < 0,05), dado principalmente por una drástica caída de la concentración de leptina a partir del inicio de la subnutrición en este último grupo. Una disminución menos marcada se evidenció en el grupo BS (Figura 3). No se observaron diferencias entre las ovejas con baja CCi.

Discusión

En este trabajo se pone en evidencia que la respuesta endocrino-metabólica a una restricción alimenticia – 0,5 M – en ovejas depende del grado de reservas corporales iniciales (o memoria metabólica), lo cual se evidencia en los diferentes patrones observados a lo largo del experimento en las concentraciones de glucosa, BHB, insulina e IGF-I.

La subnutrición a mitad de los requerimientos para mantenimiento provocó una disminución de 6 kg de PV en las ovejas con alta CCi (CCi: 2,9) y de 7,3 kg en las ovejas con baja CCi (CCi: 2,1). Resultados similares se encontraron cuando se realizaron tratamientos de subnutrición semejantes: ovejas con mejor CC (3,4) perdieron 5 kg de PV (Sosa *et al.*, 2009), mientras que ovejas más delgadas (CC de 2,9 y 2,8) perdieron 6,8 y 7 kg respectivamente (Sosa *et al.*, 2004; 2006). Esto podría deberse a que animales más engrasados (mayor CC y PV) presentan un mayor porcentaje de lípidos corporales (Caldeira y Portugal, 2007) obteniendo más energía por kg de PV movilizado (Williams *et al.*, 1989) debido a la mayor concentración energética de las grasas frente a proteínas o carbohidratos (2 a 2,5 veces mayor). Por otro lado, las ovejas AC mantuvieron su PV coincidiendo con trabajos previos (Sosa *et al.*, 2004; 2006). Sin embargo, el grupo BC aumentó su PV probablemente como una respuesta compensatoria frente a la restricción alimenticia anterior.

Las concentraciones de glucosa fueron mayores en los grupos control respecto de los subnutridos, lo que es consistente con los tratamientos efectuados. Petterson *et al.* (1993) no encontraron diferencias en concentraciones de glucosa basal entre ovejas con dietas de 1 o 0,5 M, pero en este estudio se tomó una única muestra. Sosa *et al.* (2009) observaron que la subnutrición no afectó las concentraciones de glucosa, pero la frecuencia de muestreo fue menor a la del presente estudio. Esta señal de energía disponible está finamente regulada aún en el rumiante (Chilliard *et al.*, 1998), y desencadena respuestas endocrinas específicas como las que se analizaron en el presente estudio.

La movilización de reservas provocada por la subnutrición se observó en el aumento de los AGNE tanto en animales con alta como con baja CCi. Este mecanismo de adaptación a la restricción de nutrientes es muy conocido y ha sido descrito en rumiantes y en experimentos similares al presente (Chilliard *et al.*, 1998; Sosa *et al.*, 2006; 2009). No se observaron diferencias en los niveles de AGNE de las ovejas con alta y baja CCi tras la subnutrición, a pesar de que las de alta CCi presentaban PV y CC iniciales mayores que las de baja CCi (11 kg y 0,8 puntos de CC de diferencia, respectivamente) sugiriendo una tasa de lipólisis similar entre estos grupos. Por otra parte, no se observaron diferencias importantes en las concentraciones de BHB entre grupos, sino aumentos puntuales de los grupos subnutridos frente a sus respectivos controles. Si bien estos aumentos de BHB concuerdan con aumentos anteriores o simultáneos de AGNE en estos grupos, el BHB no fue un buen indicador de restricción energética. El BHB es un producto de la degradación de los AGNE y se esperaría que el aumento de éstos estuviera acompañado por un aumento concomitante de BHB en sangre (Bouchat *et al.*, 1981; Chilliard *et al.*, 1998). Sin embargo es posible que ese efecto se observe en situaciones más extremas de balance energético negativo (por ejemplo, durante la gestación tardía) y no sea evidente en ovejas vacías.

Las concentraciones de insulina fueron mayores en las ovejas con alta CCi en comparación con las de baja CCi, reflejando un mejor estatus energético. Un hallazgo interesante de este trabajo fue la respuesta diferencial frente a la restricción alimenticia en esos dos grupos de animales: mientras que en las ovejas AS las concentraciones de insulina disminuyeron 2 semanas después de haberse iniciado el tratamiento, en las ovejas BS se observó una caída importante en el primer muestreo post-subnutrición. Teniendo en cuenta los perfiles de glucosa de estos grupos, se puede sugerir que si bien en las ovejas con baja CCi, la disminución de la glucosa actuó como señal metabólica para la regulación de la secreción de insulina, en las ovejas con alta CCi la secreción de insulina fue –al menos en parte– independiente de la caída plasmática de glucosa. La regulación de la secreción de la insulina es compleja ya que se ha demostrado en roedores que además de la glucosa, intervienen la propia insulina, la leptina y el IGF-I (ver debajo). Este hallazgo podría implicar una adaptación metabólica diferencial en la que las ovejas con niveles críticos de reservas energéticas responden rápidamente a la ingesta diaria, mientras que ovejas en un estado energético superior (reservas) presentan una mayor independencia temporal de la misma. Bouchat *et al.* (1981) sugirieron que cuando se comparan animales delgados y gordos, hay diferencias importantes en la concentración de metabolitos en sangre en situaciones de ayuno, pero el estudio realizado por estos autores no pudo demostrar esta hipótesis. La disminución de insulina en animales BS es consistente con los bajos niveles de glucosa y los altos de AGNE que en conjunto reflejan un estado catabólico acorde a la ingesta insuficiente de nutrientes. Si bien Petterson *et al.* (1993) no pudieron demostrar una disminución de insulina frente a una subnutrición similar, el número de muestras consideradas en ese estudio es pobre y las diferencias numéricas presentadas son importantes, lo que respaldaría lo observado en el presente trabajo.

Se ha demostrado que una estrategia desarrollada en el rumiante frente a la restricción alimenticia, es el desacoplamiento en el eje GH-IGF-I, resultando en aumento de las concentraciones de GH y una disminución en la concentración circulante de IGF-I (Thissen *et al.*, 1994; Chilliard *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999). Sin embargo, en nuestro estudio no se observó disminución de esta última hormona en ninguno de los grupos subnu-

tridos. De forma similar, no se observaron disminuciones importantes de IGF-I tras la subnutrición en trabajos previos (Sosa *et al.*, 2006; 2009), observándose diferencias sólo alrededor del estro (Sosa *et al.*, 2006). En el presente estudio, las concentraciones de IGF-I presentan un claro efecto de la CCi de los animales siendo superiores las concentraciones en las ovejas gordas, siendo el indicador que mejor reflejó el efecto estático de la nutrición. Los niveles de IGF-I más altos en ovejas gordas son consistentes con los niveles mayores de insulina en estos animales (Mashek *et al.*, 2001). Se ha propuesto un efecto estimulador de la insulina sobre la sensibilidad de GH hepática y consecuente síntesis de IGF-I (Butler *et al.*, 2003; Rhoads *et al.*, 2004). Una acción reciproca puede proponerse entre el páncreas y el hígado ya que también se ha demostrado una acción directa del IGF-I sobre las células b-pancreáticas, específicamente en la activación de la glucoquinasa, paso limitante para el metabolismo de la glucosa pancreática responsable de la secreción de insulina (Yoshida *et al.*, 2007).

El nivel de la leptina plasmática es el resultado de la reserva de adipocitos, pero también se modula de una manera más rápida a través del nivel de alimentación (Delavaud *et al.*, 2000). En el presente estudio, la leptina tendió a ser mayor en las ovejas AC, explicado por ser el grupo que presenta mayor cantidad de grasa corporal y ser aquel que está recibiendo mayor nivel de alimentación. En este mismo sentido, en un trabajo previo con condiciones corporales comparables al grupo A del presente estudio (Sosa *et al.,* 2009), observamos importantes diferencias entre el grupo control y el subnutrido. La leptina disminuyó drásticamente en las ovejas más engrasadas tras la subnutrición, pero esta disminución no fue tan acusada en las ovejas delgadas. Se ha demostrado que la leptina ejerce efectos inhibitorios tanto en el control de la expresión como de la secreción de insulina directamente sobre las células pancreáticas (humanos: Seufert *et al.*, 1999; roedores: Morioka *et al.*, 2007). La caída marcada de leptina observada en las ovejas AS tras la subnutrición podría ser un estímulo para el mantenimiento de insulina en plasma, aun con dietas de 0,5 M y niveles de glucosa más bajos. Por otro lado, la disminución moderada en las concentraciones de leptina tras la subnutrición en las ovejas delgadas y los niveles ya deprimidos de IGF-I podría explicar la drástica disminución de insulina. Con lo anteriormente expuesto, se podría especular que estas tres hormonas clave –insulina, leptina e IGF-I– no sólo regulan el flujo metabólico, sino que su regulación es inter-dependiente facilitando así la comunicación entre estos tres tejidos. A su vez, la leptina informa sobre el nivel de almacenamiento de energía periférica a regiones cerebrales y su acción inhibe el apetito y disminuye la tasa metabólica, por lo que la disminución de esta hormona en animales sometidos a una subnutrición facilitaría el restablecimiento de la homeostasis (Chilliard *et al.*, 2005).

Al igual que en trabajos anteriores realizados por Sosa *et al.*, (2006; 2009) se evidencia el aumento en el momento del celo de las concentraciones de los metabolitos. El resultado de esta movilización de energía alrededor del estro puede estar asociado al estrés y/o liberación de corticosterona/cortisol que se observa en varias especies incluidas los ovinos (Lyimo *et al.,* 2000; Sosa y col., datos sin publicar). Por otro lado, el aumento de insulina e IGF-I alrededor del estro en ovinos ha sido comunicado previamente (Viñoles *et al.*, 2005; Sosa *et al.*, 2006; 2009). Estos aumentos estarían asociados al estradiol-17b pre-ovulatorio que puede haber incrementado la secreción pancreática de insulina como ha sido sugerido para ratas (Nadal *et al.*, 1998; Morimoto *et al.*, 2001) y síntesis de IGF-I y/o sus proteínas de unión como se ha determinado

en ovejas y vacas (Clapper *et al.*, 1998; Colak *et al.*, 2011). Asimismo, el aumento al estro del IGF-I puede explicarse por el aumento de insulina, ya que en vacas se ha descrito que la insulina aumenta las concentraciones hepáticas del mRNA de IGF-I (Butler *et al.*, 2003; Rhoads *et al.*, 2004). Este estudio muestra la relevancia de que en los estudios metabólicos los animales hayan sido sincronizados para presentar el celo al mismo tiempo, y abre una nueva perspectiva respecto del papel de las hormonas reproductivas sobre la regulación de las hormonas metabólicas.

En conclusión, en este estudio se encontró que los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I varían de forma diferente frente a una restricción alimenticia en función del grado de reservas corporales de las ovejas en el momento de iniciarse la restricción alimenticia.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos AGL2007-63822/GAN y AGL2010-15004.

Bibliografía

Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Lozano JM, 1993. Effect of plane of protein after weaning on resumption of reproductive activity in Rasa Aragonesa ewes lambing in late spring. *Theriogenology.* 39(2): 463-473.

Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SR, 1995. Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Animal Science.* 61: 57-62.

Adrien ML, Mattiauda DA, Artegoitia V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A, 2011. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of postpartum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal;* in press.

Agricultural and Food Research Council (AFRC), 1993. Energy and protein requeriments of ruminants. An advisor manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. Wallingford, UK, CAB International.

Bell AW, 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci.* 73(9): 2804-2819.

Bell AW, Bauman DE, 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2(3): 265-278.

Blache D, Zhang S, Martin GB, 2006. Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev.* 46(4): 379-390.

Blanc F, Bocquier F, Agabriel J, D'Hour P, Chilliard Y, 2006. Adaptive abilities of the females and sustainability of ruminant livestock systems. A review. *Animal Research.* 55: 489-510.

Bouchat JC, Doize F, Paquay R, 1981. Influence of diet and prolonged fasting on blood lipids, ketone bodies, glucose and insulin in adult sheep. *Reprod Nutr Dev.* 21(1): 69-81.

Breier BH, 1999. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. *Domest Anim Endocrinol.* 17(2-3): 209-218.

Burke CR, Roche JR, 2007. Effects of pasture feeding during the periparturient period on postpartum anovulation in grazed dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(9): 4304-4312.

Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR, 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol.* 176(2): 205-217.

Caldeira RM, Portugal AV, 2007. Relationships of body composition and fat partition with body condition score in Serra da Estrela ewes. *Asian-Australian Journal of Animal Science.* 20(7): 1108-1114.

Clapper JA, Snyder JL, Roberts AJ, Hamernik DL, Moss GE, 1998. Estradiol increases relative amounts of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in serum and expression of IGFBP-2 in anterior pituitaries of ewes. *Biol Reprod.* 59(1): 124-130.

Colak M, Shimizu T, Matsunaga N, Murayama C, Nagashima S, Kataoka M, Kawashima C, Matsui M, Dorland HV, Bruckmaier R, Miyamoto A, 2011. Oestradiol Enhances Plasma Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I Concentrations and Increased the Expression of their Receptors mRNAs in the Liver of Ovariectomized Cows. *Reprod Domest Anim.*

Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M, 1998. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev.* 38(2): 131-152.

Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F, 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol.* 21(4): 271-295.

Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M, 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 29(1): 3-22.

Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, Bocquier F, 2000. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc Nutr Soc.* 59(1): 127-134.

Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G, 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol.* 165(2): 519-526.

Etherton TD, 2004. Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci.* 82 E-Suppl: E239-244.

Flint DJ, Binart N, Kopchick J, Kelly P, 2003. Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. *Pituitary.* 6(2): 97-102.

Ingvartsen KL, Andersen JB, 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci.* 83(7): 1573-1597.

Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy MC, 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 140(9): 3947-3954.

Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B, 1998. Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology.* 49: 539-546.

Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TA, van Eerdenburg FJ, 2000. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology.* 53(9): 1783-1795.

Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D, 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 82-83: 231-245.

Mashek DG, Ingvartsen KL, Andersen JB, Vestergaard M, Larsen T, 2001. Effects of a four-day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Domest Anim Endocrinol.* 21(3): 169-185.

Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien L, Ruprechter G, Rovere G, Peñagaricano F, Mendoza A, Pereira I, Mattiauda D, Chilibroste P, 2010. Endocrinología metabólica en la vaca lechera durante el período de transición y su relación con el reinicio de la ciclicidad ovárica. *Agrociencia.* 14(3): 89-95.

Morimoto S, Cerbon MA, Alvarez-Alvarez A, Romero-Navarro G, Diaz-Sanchez V, 2001. Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sci.* 68(26): 2979-2985.

Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN, 2007. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest.* 117(10): 2860-2868.

Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B, 1998. Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J.* 12(13): 1341-1348.

Pedron O, Cheli F, Senatore E, Baroli D, Rizzi R, 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Dairy Sci.* 76(9): 2528-2535.

Petterson JA, Dunshea FR, Ehrhardt RA, Bell AW, 1993. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J Nutr.* 123(7): 1286-1295.

Pinotti L, Rosi F, 2006. Leptin in bovine colostrum and milk. *Horm Metab Res.* 38(2): 89-93.

Quintans G, 2008. Algunas estrategias para disminuir la edad al primer servicio en vaquillonas. *Serie técnica. Seminario de actualización técnica: Cría vacuna. INIA.*(174): 53-55.

Quintans G, Roing G, 2008. Principales factores que afectan la aparición de la pubertad en vaquillonas de razas carniceras. *Seminario de actualización técnica: Cría vacuna. Serie técnica INIA.* 174: 56-58.

Renaville R, Hammadi M, Portetelle D, 2002. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 23(1-2): 351-360.

Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Segoale N, Frank SJ, Bauman DE, Boisclair YR, 2004. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutr.* 134(5): 1020-1027.

Russel AJF, Doney JM, Gunn RG, 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science* 72: 451-454.

Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF, 1999. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(2): 670-676.

Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacin I, Meikle A, 2009. Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol.* 36(1): 13-23.

Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Vinoles C, Tasende C, Valares JA, Palacin I, Martin GB, Meikle A, 2006. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev.* 18(4): 447-458.

Sosa C, Lozano JM, Vinoles C, Acuna S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M, Meikle A, 2004. Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci.* 84(3-4): 337-348.

Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE, 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev.* 15(1): 80-101.

Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A, 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction.* 129(3): 299-309.

Whitaker D, Goodger W, Garcia M, Perera B, Wittwer F, 1999. Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Prev Vet Med.* 38(2-3): 119-131.

Williams CB, Oltenacu PA, Sniffen CJ, 1989. Refinements in determining the energy value of body tissue reserves and tissue gains from growth. *J Dairy Sci.* 72(1): 264-269.

Yasari S, Wang D, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM, 2009. Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats. *Mol Cell Biochem.* 324(1-2): 13-20.

Yoshida K, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Ahmed RA, Kitanaka N, Wong NC, Unterman TG, Magnuson MA, Ishida T, 2007. Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 148(6): 2904-2913.

(Aceptado para publicación el 29 de agosto de 2011)

Estudio de la neosporosis en muestras de leche de tanque e individuales y su relación con factores de manejo de la explotación y de calidad de la leche

C. Nogareda*[1], R. Colomé*, M. Navarro*, R. Armengol* y A. Jubert**

[1] Autor para correspondencia: Tel. +34 973 00 36 62; Fax +34 973 70 28 74
E-mail: cnogareda@prodan.udl.cat
* Departamento de Producción Animal, Centro de Investigación en Producción Animal (CIPA) de la Universitat de Lleida (UdL) 25198 Lleida; Spain
** ALLIC (Asociación Interprofesional Lechera de Cataluña) Ctra. Vilassar a Cabrils, s/n 08348 Cabrils (Barcelona), Spain

Resumen

La neosporosis, causada por el parásito *Neospora caninum* es una de las causas más importantes de abortos de ganado bovino a nivel mundial. En este trabajo se ha estudiado la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* en muestras de leche de tanque e individuales con un test ELISA indirecto comercial. Se visitaron y encuestaron 16 explotaciones catalanas de las que el 69% fueron positivas. Del análisis estadístico de la encuesta se obtuvo una relación significativa entre la positividad del tanque y la presencia de perros en la explotación. Finalmente, se analizó individualmente la leche de cuatro granjas y los resultados se relacionaron con los parámetros de calidad de la leche correspondiente a cada vaca. Los resultados demostraron de forma significativa que mayores niveles de anticuerpos en leche se relacionaban con porcentajes más altos de proteína pero más bajos de lactosa.

Palabras clave: neosporosis, anticuerpos, ELISA, leche, vacuno, prevalencia.

Summary
Study of neosporosis in bulk tank and individual milk samples and their relationship with farm management and milk quality

Neosporosis is a disease caused by the parasite *Neospora caninum* considered one of the most important cause of abortion on cows worldwide. We have studied the presence of antibodies against *N. caninum* analyzing the bulk tank and the individual milk using a commercial indirect ELISA test. Sixteen farms were visited and surveyed and from them 69% were positives. Statistical analysis showed that the antibodies were higher in the bulk tank in the herds in which dogs were present on the farm. Finally, the individually cow's milk was analyzed in four farms and the results were related with their individual milk quality parameters and it was observed that level of positivity to *N. caninum* in individual milk was related to increased protein but to decreased lactose in milk.

Key words: neosporosis, antibodies, ELISA, milk, bovine, prevalence.

Introducción

La neosporosis es una enfermedad causada por *Neospora caninum,* un protozoo intracelular obligado, estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii* que se describió por primera vez en perros en 1984 (Bjerkas *et al.*, 1984). El ciclo de *N. caninum* es indirecto y existen tres estadios infectantes. Los dos primeros están en el interior de los huéspedes intermediarios (HI), principalmente en las vacas y el tercer estadío son los ooquistes que excretan los perros u otros carnívoros que son los huéspedes definitivos (HD) (McAllister *et al.*, 1998).

Los HD ingieren los quistes al consumir parte de placentas o fetos abortados de vacas infectadas y en su interior se desarrolla la fase sexual del parásito con la formación de ooquistes que se excretan y esporulan en el medio ambiente convirtiéndose en infectantes para los HI (Almería y López-Gatius, 2009). Existe también la forma vertical o endógena de mantener la infección en un rebaño que se produce cuando la madre positiva infecta al feto durante la gestación mediante trasmisión transplacentaria (Trees y Williams, 2005) por lo que las hembras positivas contribuyen al mantenimiento de la infección (Hietala y Thurmond, 1999).

La neosporosis está asociada al riesgo de aborto en vacas lecheras, la mayoría entre los 5-7 meses de gestación. (López-Gatius *et al.*, 2005). Durante la gestación, los fetos pueden morir en el útero, ser reabsorbidos o momificados, pero si la gestación llega a termino, los terneros pueden nacer muertos o vivos con síntomas clínicos o bien nacer clínicamente normales pero crónicamente infectados (Dubey, 2003).

El diagnóstico en animales vivos se basa en la detección de anticuerpos específicos anti-*Neospora* en el suero sanguíneo o en la leche. Se han desarrollado numerosas pruebas ELISA comerciales para la detección de anticuerpos específicos con sensibilidad y especificidad elevada (Blumröder *et al.*, 2004 Bartels *et al.*, 2006). Algunos han sido adaptados para poder analizar muestras de leche (Schares *et al.*, 2004, Bartels *et al.*, 2005). Recientemente en Galicia se ha llevado a cabo un estudio de la enfermedad en leche y en suero sanguíneo demostrando resultados muy coincidentes en ambos tipos de muestras (Gonzalez-Warleta *et al.* 2011).

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* en muestras de leche de tanque en 16 explotaciones de ganado vacuno de Cataluña, estudiar los posibles efectos y factores de riesgo de la enfermedad mediante una encuesta al ganadero y conocer si existe relación entre los niveles de anticuerpos anti-*Neospora* en la leche individual y sus parámetros de calidad.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Las muestras de leche se consiguieron a través de la Asociación Interprofesional lechera de Cataluña (ALLIC), Cabrils (Barcelona). Esta asociación recibe diariamente muestras de cada tanque de leche recogido en las granjas y controlan sus parámetros de calidad físico-químicos y microbiológicos. Mensualmente reciben las muestras individuales de todas las vacas en lactación para hacer el control lechero. Para el estudio, las muestras de leche cruda se recogieron en el laboratorio de la ALLIC y se trasladaron al laboratorio del CIPA de la Universidad de Lleida. Tanto las muestras de leche de tanque como las individuales se obtuvieron en frascos de plástico con un volumen aproximado de 25 ml a 4ºC conservadas con azidiol (conservante bacteriostático) en el caso de leche de

tanque o bronopol (conservante bactericida) en el caso de leche individual. ALLIC facilitó los correspondientes resultados del análisis de los parámetros de calidad: grasa, proteína, lactosa, extracto seco magro (ESM), células somáticas y urea.

Tipo de muestras y toma de datos

Se analizaron 16 muestras de tanque que correspondieron a explotaciones que se visitaron y encuestaron (8 de la provincia de Barcelona, 4 de Lleida y 4 de Girona). No se analizaron muestras de la provincia de Tarragona debido al escaso número de granjas de vacuno lechero en esta provincia. La encuesta constaba de 46 preguntas que se hicieron directamente al ganadero. Las preguntas estaban relacionadas con datos de la explotación, los nacimientos, los abortos, el manejo de los fetos abortados, la presencia de perros en la explotación y su contacto (o el de sus heces) con las vacas o con el pienso, forraje etc., de manera que se pudieran evidenciar posibles síntomas, problemas reproductivos o cuadros clínicos de neosporosis.

En un segundo apartado se analizaron individualmente 261 muestras de leche de cuatro granjas positivas (de 60, 96, 52 y 53 vacas en lactación en el momento del análisis) en el estudio anterior y de cada muestra se obtuvieron datos de los parámetros de calidad proporcionados por ALLIC.

Análisis de anticuerpos anti-*Neospora* de las muestras

Para la detección de los anticuerpos anti-*Neospora* en la leche, tanto de tanque como individual, se utilizó un kit comercial de ELISA indirecto: (CIVTEST® anti-*Neospora*; Hipra, Girona). Esta técnica utiliza como antígeno un lisado del taquizoito completo denominado NC-1 (Dubey, 1988) que se encuentra adherido a las microplacas del kit. Se siguieron las instrucciones del fabricante utilizando los reactivos y los controles positivos y negativos suministrados en el kit.

Las muestras de leche cruda se desnataron centrifugándose a 4º C a 1000 g durante 15 minutos. Para el análisis se dispensaron 100 µl de leche desnatada por muestra directamente en los pocillos de la placa del kit. Después de añadir los controles se mantuvo la placa durante 16-18 horas en la nevera a 4º C. Después del lavado se añadieron 50 µl de la solución de conjugado y la placa se incubó en estufa a 37º C durante 60 minutos. Después de otro lavado se dispensaron 50 µl de la solución cromógena y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se frenó la reacción con 50 µl de la solución de parada y se cuantificó el color de los pocillos de la placa utilizando un lector ELISA equipado con un filtro de 405 nm. El color de cada pocillo expresado en densidades ópticas (DO) será proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos anti-*Neospora*.

Para la interpretación de los resultados se calculó el índice relativo x 100 (IRPC) de cada muestra:

$$IRPC = [(DO_{405}\text{muestra} - \text{Media } DO_{405}\text{ Control negativo}) / (\text{Media } DO_{405}\text{ Control positivo} - \text{Media } DO_{405}\text{ Control negativo})] * 100.$$

Interpretación de los resultados

En el protocolo del kit, para la leche de tanque, cuando el valor de IRPC es menor o igual a 3,0 se considera que la prevalencia de anticuerpos anti-*Neospora* en los animales que aportan leche al tanque es inferior al 5-10% y cuando el IRPC es mayor que 3,0 la prevalencia estará por encima del 10%. En nuestro estudio y para poder analizar estadísticamente los resultados, las explotaciones con valores menores o iguales a 3,0 se consideraron negativas y las superiores a 3,0 positivas.

Siguiendo el protocolo del kit, para la leche individual, cuando el valor de IRPC es menor o igual a 4,74 la muestra es considerada negativa a *N.caninum*, y cuando es superior a 4,74 positiva.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de asociación entre la variable discreta IRPC (positiva; negativa) y los factores de riesgo obtenidos a partir de las respuestas de la encuesta. Las preguntas y los niveles de respuesta fueron las siguientes: tamaño explotación (grande; mediana; pequeña) terneros nacidos con menor peso (alguna vez; nunca), mortalidad de terneros al nacimiento (frecuente; alguna vez; nunca), estación del año con más abortos (verano; sin predominio), trimestre de gestación con más abortos (primero; segundo y tercero), presencia de restos de abortos y placentas (si; no) presencia de perros (si; no) y observación de heces de perro en la granja (normalmente; alguna vez; nunca). Este análisis se ha realizado mediante el procedimiento FREQ del SAS versión 9.2 (Stalistical Analysis Software, Cary, NC). El efecto de los diferentes factores de riesgo sobre la variable continua nivel de IRPC ha sido analizado mediante un análisis de varianza para cada factor mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS. En el caso de las muestras de leche individuales los parámetros de calidad de la leche también se relacionaron con el IRPC, tanto por regresión lineal (IRPC como variable explicativa), como por análisis de varianza para analizar si existía alguna diferencia entre los animales positivos y los negativos.

Resultados

De las 16 explotaciones analizadas en este estudio, 11 (68,8%) fueron positivas y 5 (31,2%) negativas. En la provincia de Barcelona fueron positivas 6 de las 8 granjas analizadas y 3 en Girona y 2 en Lleida de las 4 granjas analizadas en cada una de estas provincias.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los principales factores relacionados con la media del IRPC para cada respuesta y su significación. Al relacionar los diferentes factores considerados como variables discretas en la encuesta con la variable continua IRPC, se observó que había un efecto significativo ($P<0,05$) entre el riesgo de la presencia de perros y la presencia de anticuerpos en leche de tanque en las explotaciones analizadas. En 10 de las 11 explotaciones positivas y en 3 de las 5 negativas había presencia de perros. Ningún otro factor de la encuesta resultó significativo.

Los resultados del análisis de regresión GLM entre el IRPC de la leche de 261 vacas y los parámetros de calidad individual como variables continuas se muestran en la Tabla 2. Los parámetros afectados significativamente por el IRPC fueron la proteína y la lactosa, de forma que las vacas con más anticuerpos produjeron leche con mayor porcentaje de proteína y menor porcentaje de lactosa ($P<0,01$). En la Tabla 3, se puede observar la relación entre los diferentes parámetros de calidad de la leche según la positividad a *Neospora* de la vaca (83 vacas positivas y 178 negativas). Los datos de los parámetros de calidad de la leche de los animales analizados son algo superiores a la media de los datos del mismo mes del estudio durante 7 años (febrero) (3,82% de grasa, 3,18% de proteína, 4,66% de lactosa y 8,57% de ESM) (www.allic.org).

Tabla 1. Resultados de la regresión (GLM) de las 16 explotaciones encuestadas entre los diferentes niveles de respuesta obtenidos en la encuesta y la media del IRPC (niveles de anticuerpos anti-Neospora mediante ELISA indirecto)
Table 1. Regression results (GLM) of the 16 farms relating different levels of response obtained in the survey and the IRPC (antibody anti-Neospora levels by indirect ELISA)

Factores de riesgo	Niveles	Media IRPC	Desviación estándar
Tamaño explotación	Grande (> 150 vacas)	8,26	2,82
	Mediana (50-150 vacas)	7,02	2,82
	Pequeña(< 50 vacas)	6,96	2,30
Terneros nacidos con menor peso del esperado	Alguna vez	6,88	2,41
	Nunca	8,19	1,80
Mortalidad de terneros al poco de nacer (15 días)	Frecuente	10,69	2,56
	Alguna vez	6,52	2,09
	Nunca	5,25	2,56
Estación del año con mayor porcentaje de abortos	Verano	9,36	3,07
	No hay predominio	6,8	1,60
Trimestre de gestación con mayor porcentaje de abortos	Primero	7,70	2,21
	Segundo y tercero	7,08	1,92
Presencia de restos de aborto y placentas	Si	8,76	3,10
	No	6,96	1,62
Presencia de perros	Si	8,81*	1,36
	No	1,98	2,61
Observación de heces de perro alrededor de la granja	Normalmente	9,74	2,43
	Alguna vez	9,45	2,43
	Nunca	4,35	1,99

* P<0,05.

Tabla 2. Resultados de la regresión (GLM) de los 261 análisis de las muestras de leche expresados en IRPC (niveles de anticuerpos anti-*Neospora* mediante ELISA indirecto) y los parámetros de calidad con los valores de la pendiente de la recta (b) y la significación
*Table 2. Results of regression (GLM) of the 261 individual tests in IRPC (antibody anti-*Neospora *levels by indirect ELISA) and the quality parameters with the values of the line slope (b) and significance*

Factor	Grasa	Proteína	Lactosa	ESM	log (cel)	Urea
b	0,003	0,007**	-0,003**	0,003	0,003	-0,660

** P < 0,01.

Tabla 3. Resultados de la regresión (GLM) entre los parámetros de calidad de la leche de 261 vacas diferenciando animales positivos y negativos a anticuerpos anti-*Neospora* mediante ELISA indirecto
*Table 3. Regression results (GLM) of the milk quality parameters of 261 cows differentiating negative and positive animals to antibody anti-*Neospora *by indirect ELISA*

	Media animales positivos	Desviación estándar	Media de los animales negativos	Desviación estándar
Grasa (1)	3,896	0,083	3,829	0,051
Proteína (1)**	3,495	0,051	3,331	0,032
Lactosa (1)**	4,761	0,033	4,867	0,020
ESM (1)	8,999	0,054	8,966	0,033
log (cel) (2)	2,055	0,067	1,983	0,041
Urea (3)	207,00	8,941	216,55	5,705

** P<0,01.

(1) % Peso/Peso; (2) células somáticas (x1000/ml); (3) mg/l.

(1) % Weight/Weight; (2) somatic cells (x1000/ml); (3) mg/l.

Discusión

El presente estudio es el primero que se ha realizado analizando la neosporosis en muestras de leche de tanque e individual en Cataluña. Otros autores utilizando otro kit comercial (Herd Check Anti-*Neospora* ELISA, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) para determinar la presencia de anticuerpos en leche han comprobado que es una muestra válida para el análisis de la prevalencia de anticuerpos de esta enfermedad (Schares *et al.*, 2004, Wapenaar *et al.*, 2007).

A diferencia del calostro, el contenido de inmunoglobulinas en la leche es casi 30 veces menor que en el suero de la sangre (Korhonen *et al.*, 2000), pero aún así es una muestra a tener en cuenta para el diagnóstico de la neosporosis. Las ventajas del uso de la leche es su fácil obtención a través de las empresas que realizan el control lechero, una vez ellos han finalizado sus análisis (suelen obtener muestras de tanque cada día y muestras individuales por vaca una vez al mes) ya que no se molesta ni a las vacas ni a los ganaderos. La desventaja es que sólo obtenemos muestra de las vacas que están en lactación en el momento de la recogida de muestras. Resultados previos a este estudio demostraron que la enfermedad se encuentra en casi el 90% de las explotaciones catalanas (Nogareda et al, sometido), sin detectarse diferencias importantes entre zonas geográficas. Para ello se analizaron 90 explotaciones de las 814 censadas en el momento del estudio. Estos resultados nos animaron a estudiar y encuestar de manera más profunda a dieciséis granjas de las zonas lecheras de Cataluña. Somos conscientes que las 16 granjas encuestadas son una muestra reducida de la población total y eso ha dificultado poder encontrar diferencias significativas que relacionen las respuestas de los ganaderos con los resultados de los análisis en el tanque de leche. Sin embargo, se observó una relación significativa entre los niveles de anticuerpos anti-*Neospora* y la presencia de perros en las explotaciones ya fueran propios o forasteros ocasionales. Estos resultados son destacables ya que confirman que los perros juegan un papel

importante en la transmisión de la enfermedad. Wouda *et al.* (1999) observaron que en explotaciones donde los perros no estaban presentes la seroprevalencia fue significativamente menor que en granjas donde sí lo estaban. También Vázquez-Moreno (2007), observó una asociación positiva entre la seropositividad del perro y la de las vacas al estudiar la presencia de *N. caninum* en poblaciones de perros de granja.

Como las vacas se pueden infectar al ingerir ooquistes esporulados que provienen de las heces de los perros se preguntó al granjero si había observado heces de perro alrededor de la explotación, pero no se obtuvieron resultados significativos entre la positividad del tanque y sus respuestas (Tabla 1). Sin embargo debe destacarse que la media de los niveles de anticuerpos de los tanques fue menor (4,35) cuando la respuesta fue que nunca observaron heces de perro alrededor de la granja, comparada con los niveles medios obtenidos cuando las heces se observaban normalmente (9,74) o alguna vez (9,45). Esta amplia diferencia demuestra la importancia de las heces de los perros en la transmisión de la enfermedad en las granjas. También se preguntó en la encuesta sobre diferentes repercusiones clínicas descritas de la enfermedad, como la existencia de abortos, el trimestre de gestación, el porcentaje de terneros nacidos muertos, o bien de terneros con lesiones musculares o con menos peso del normal sin obtenerse relaciones significativas. Tal como se ha mencionado anteriormente, se necesitaría un número mayor de granjas y más estudios para poder relacionar correctamente estas respuestas con el muestreo de los tanques.

Como el ciclo biológico de la enfermedad se mantiene al infectarse los perros al consumir carne o fetos abortados infectados, se preguntó si los restos de los abortos se controlaban (es decir si el manejo de la granja facilita que los residuos biológicos puedan ser consumidos por los perros). No se evidenció ninguna relación entre este control y los resultados de los análisis. Hay que tener en cuenta que el ganadero no siempre puede controlar la presencia de perros o sus heces o retirar los fetos u otros restos de abortos ya que durante la noche son difícilmente controlables. Respecto al tamaño de la explotación, no se observó ningún efecto significativo pero se apreció que las explotaciones grandes (correspondientes a explotaciones de más de 150 vacas) eran más positivas que las pequeñas.

Al disponerse de los resultados de los parámetros de calidad de la leche individual que facilitó ALLIC, se pudieron comparar estos resultados con el nivel de anticuerpos de cada vaca. No se observaron diferencias entre vacas positivas y negativas en cuanto a grasa, extracto seco magro, células somáticas o cantidad de urea de la leche. Pero sí se obtuvieron diferencias significativas de manera que las vacas con más anticuerpos anti-*Neospora* producían leche con mayor porcentaje de proteína, pero a su vez con menor porcentaje de lactosa. Al estudiar esta relación la recta (b) da valores muy bajos debidos seguramente a la intervención de otros factores que influyen en los porcentajes de proteína y lactosa. Sin embargo, estas diferencias significativas se confirmaron al comparar la media de la proteína y la lactosa de los animales positivos y de los negativos donde se observa claramente que la media de la proteína de los animales positivos es significativamente superior que la de los negativos y por el contrario, la media de la lactosa es significativamente inferior en las vacas positivas que las negativas. Según Pfeiffer *et al.* (2002) la proteína en la leche podría verse afectada en animales positivos a neosporosis, pero en su trabajo no queda claro de qué manera afecta. No se ha encontrado ningún otro estudio donde se observe que la proteína y la lactosa se vean afectadas por la infección como tampoco se ha hallado para ningún otro parámetro de calidad de leche. De hecho Hall, *et al.* (2005) no encontraron diferencias significativas ni en la proteína ni en la

producción de grasa entre las vacas seropositivas y las seronegativas a *Neospora* confirmado en otro estudio posterior (Hall, *et al.*, 2006) en el que volvieron a demostrar que no había ningún efecto para la proteína y para la grasa ni en las células somáticas. Por tanto, el efecto de la proteína y la lactosa provocado por el aumento de anticuerpos no es fácil de justificar y deberían hacerse más estudios para demostrar esta relación. Por otra parte, no se cree que el aumento de inmunoglobulinas en la leche debido a los anticuerpos anti-*Neospora* sea suficiente como para aumentar significativamente este parámetro, ya que éstas representan un porcentaje muy bajo de las proteínas totales de la leche (Korhonen *et al.*, 2000).

A la vista de estos resultados se puede deducir que los análisis de anticuerpos anti-*Neospora* de las muestras de leche de tanque son orientativos, pero pueden ser una buena opción para llevar un control de la enfermedad en las granjas. Debido a que la obtención de una vacuna eficaz que prevenga la neosporosis está aún en fase de estudio (Aguado-Martínez *et al.*, 2009, Monney *et al.*, 2011), el análisis individual de la leche, al igual que el análisis del suero sanguíneo, seria muy útil para controlar la transmisión vertical en la granja, ya que es aconsejable deshacerse de las vacas positivas (Hall *et al.*, 2006).

Además de la restricción de la entrada de perros en las granjas bovinas, otra estrategia para reducir el riesgo de aborto en vacas positivas es su inseminación con semen de vacuno de carne, con lo que disminuye la prevalencia de la neosporosis al descartar a las hijas como reposición. Por otro lado, se ha demostrado que la inseminación con semen de vacas cárnicas, sobre todo de la raza Limusina reduce el porcentaje de abortos en las vacas positivas (López-Gatius *et al.*, 2005, Almeria *et al.*, 2009).

Las principales conclusiones de este estudio serían las siguientes: Mediante el análisis de leche de tanque se observó una alta prevalencia de anticuerpos frente *N. caninum* en las explotaciones analizadas, aunque las titulaciones predominantes fueron bajas. Mediante encuestas a los ganaderos, se obtuvo una relación significativa entre la presencia de perros en la explotación y la positividad de los tanques de leche. Las vacas con anticuerpos anti-*Neospora* produjeron leche con un porcentaje significativamente más alto de proteína pero más bajo de lactosa que los animales sin anticuerpos.

Agradecimientos

A Daniel Villalba por su colaboración en los análisis estadísticos de los datos, a HIPRA por la cesión de los kits de diagnóstico, al personal de ALLIC (Associació Interprofesional Lletera de Catalunya) y al Observatori de la Llet por su ayuda. Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto CICYT AGL2010-21273-C03-01/GAN.

Bibliografía

Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Fernández-García A, Risco-Castillo V, Marugan-Hernández V, Ortega-Mora LM, 2009. Reduced vaccine efficacy against neosporosis in mice generated by *Neospora caninum* immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7. Vaccine27: 7331-7338.

Almería S y López-Gatius F. 2009. Aspectos epidemiológicos de la neosporosis bovina en el Nordeste español. Una perspectiva clínica. ITEA 105:296-312.

Almería S, López-Gatius F, García-Ispierto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G,Serrano B, Santolaria P, Yániz JL. 2009. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. Vet Parasitol. 163:323-329.

Bartels CJM, van Maanen C, van der Meulen AM, Dijkstra T., Wouda W, 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. Vet Parasitol 131: 235-246.

Bartels CJM, Arnaiz-Seco J, Ruiz-Santa-Quiteria A., Björkman C., Frössling J., von Blumröder D, 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. Vet. Parasitol 137:17-27.

Bjerkås I, Mohn S F, Presthus J, 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd. 70, 271-274.

Björkman C, Holmdahl OJ, Uggla A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. Vet Parasito. Feb; 68:251-60.

Blumröder von D, Schares G, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frössling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths FJ. 2004. Comparición and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. Vet Parasitol. 120: 11-22.

Dubey, JP, Hattel AL, Lindsay D S, Topper MJ, 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J Amer Vet Med Associ. 193:1259-1263.

Dubey JP, 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. The Korean Journal of Parasitology 41: 1-16.

Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro-Moral C Mezo M, 2011.Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. Prev Vet Med 101: 58-64

Hall CA, Reichel MP, Ellis JT, 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. Vet Parasitol128:231–241.

Hall CA, Reichel MP, Ellis JT, 2006. Prevalence of *Neospora caninum* infection in Australian (NSW) dairy cattle estimated by a newly validated ELISA for milk. Vet Parasitol. 142:173-178.

Hietala, SK y Thurmond MC, 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. Int. J. Parasitol. 29:1669-1676.

Korhonen H, Marnila P, Gill HS, 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. British J Nutrition, 84, Suppl. 1 S75-S80.

López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Almería S, 2005. The Use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. J. Vet. Med. B 52, 88-92.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WS, Wills RA, McGuire AM, 1998. Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J Parasitol. 28:1473-1479.

Monney T, Debache K, Heemphill A, 2011. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. Animals 1:306-325.

Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtela JJ, Teaguec WR, 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. Prev Vet Med. May 30:11-24.

Schares G, Bärwald A, Staubach C, Wurm R Rauser M, Conraths FJ, Schroeder C, 2004. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. Vet Parasitol120: 55-63.

Trees AJ, Williams DJL, 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol. 21: 558-561.

Vázquez-Moreno E, 2007. Presencia de *Neospora caninum* y otros parásitos gastrointestinales en perros procedentes de poblaciones de riesgo en España. RCCV Vol. 1 (2).

Wapenaar W, Barkema, HW, O'Handley RM, Bartels CJM 2007. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in bulk milk to estimate the prevalence of *Neospora caninum* on dairy farms in Prince Edward Island, Canada. Can Vet J 2007; 48:493-499.

Wouda W, Dijkstra T, Kramer AM, van Maanen C, Brinkhof JM. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. International Journal for Parasitology, 29:1677,1682.

(Aceptado para publicación el 3 de noviembre de 2011)

Optimización de la fertilización orgánica a través de niveles críticos de fósforo, potasio y materia orgánica en suelos de huertos intensivos

R. Caballero*, M. Vento, P. Chaveli, I. Corrales, P. López, D. Rodríguez y L. Fase

Instituto de Suelos. Dirección Provincial Camagüey. Cacocúm #11. Reparto Puerto Príncipe, Camagüey
* Autor para correspondencia: rcaballero@suelos.eimanet.co.cu

Resumen

Los suelos de los huertos son sometidos a una explotación intensiva, por lo que es importante hacer un buen manejo en su fertilización orgánica con el objetivo de lograr mayor precisión a la hora de llevar a cabo dicha fertilización y obtener a su vez incrementos sostenidos de los rendimientos, sin que se deterioren los mismos; para ello se llevó a cabo un estudio en dos huertos intensivos, donde se determinaron los niveles críticos externos de fósforo, potasio y materia orgánica; se evaluaron además los efectos combinados de dosis de compost de estiércol vacuno (0, 5, 10 y 15 kg/m^{-2}), aplicados en tres momentos (al inicio, cada dos cultivos y en cada cultivo) en una secuencia de hortalizas, durante tres años; mediante un diseño de bloques al azar con arreglo factorial y tres repeticiones. Se realizaron muestreos en los suelos al inicio y al término de cada ciclo de cultivo, determinándose el pH (H_2O), fósforo, potasio y el % de materia orgánica. Del análisis de los resultados se obtuvieron los límites críticos: fósforo (16 mg/100 g), potasio (20 mg/100 g) y materia orgánica (11 %); cuando los valores estén por debajo de los anteriores, se debe aplicar 10 kg/m^2 de compost de estiércol vacuno cada dos cultivos, para lograr rendimientos por encima de 30 kg/m^2 de hortalizas por ciclo, si los valores fueran superiores, no se aplica.

Palabras clave: Compost de estiércol, rendimiento, hortalizas.

Summary
Optimization of the organic fertilization through critical levels of phosphorus, potassium and organic matter in intensive orchards soils

Soils of the orchards are subjected to an intensive exploitation, for that reason is important to make a good handling in their organic fertilization with the objective of achieving bigger precision when to carry out this fertilization and to obtain sustained increments of the yields in turn, without they deteriorate the same ones; for it, a study in two intensive orchards was carried out, where the critical external levels of phosphorus, potassium and organic matter contents were determined; the combined effects of dose of compost of bovine manure (0, 5, 10 and 15 kg/m^2) applied in three moments (beginning, each two cultivations and in each cultivation) in a vegetable sequence were also evaluated, during three years; by means of a random block design with factorial arrangement and three repetitions. Soil samplings, at beginning and at the end of each cultivation cycle were maken to determine pH (H_2O), phosphorus, potassium and of organic matter percent. Of the analysis results, the following critical limits were obtained: phosphorus (16 mg/100 g), potassium (20 mg/100 g) and organic matter (11 %); when these values are for under, 10 kg/m^2 of compost of bovine manure should be applied each two cultivations, to achieve yields above 30 kg/m^2 of vegetables for cycle; if the values were superior to them, it is not applied.

Key words: Compost of manure, yield, vegetables.

Introducción

El método de producción de alimentos en las ciudades o agricultura urbana como se denomina, es definido por Pérez (1995) y Companioni y col (1998), como toda producción agrícola o pecuaria que se realiza dentro de las ciudades o en su periferia hasta el límite aquel donde recibe influencia directa de la ciudad sobre su desarrollo, o su proceso productivo transcurre en vinculación directa con el factor urbanístico o con sus pobladores.

En Cuba la agricultura urbana ha alcanzado un auge extraordinario a través de la producción de vegetales en la modalidad de huertos intensivos fundamentalmente. Esta modalidad debe producir hortalizas todo el año; por lo que los suelos de los huertos son sometido a una explotación y manejo intensivo, donde la extracción de las distintas hortalizas, más el riego constante provocan deterioro de las propiedades físicas, químicas y biológicas, y por tanto disminución de la fertilidad y los rendimientos.

Es por ello que un gran número de investigadores como Carrión y col. (1995), Arias (1996), Abad (1997), Companioni y col. (1998), Heredia (1998), Pérez (1999) y Caballero y col. (2003), plantean que para lograr altos rendimientos en este sistema se hace necesario entre otras cosas el uso continuo de residuales orgánicos que garanticen incrementos altos y sostenidos de los rendimientos y que a su vez mantenga la fertilidad de los suelos.

Por todo lo anteriormente planteado el presente trabajo tuvo como objetivo la determinación de los niveles críticos externos de P_2O_5, K_2O y de materia orgánica, en suelos de huertos intensivos, con vista a tener una opción más que permita recomendar la fertilización orgánica en este sistema de producción.

Materiales y métodos

Las investigaciones se condujeron en dos huertos intensivos (autoconsumo del Centro Nacional Avícola de la provincia –CAN Provincial– y del productor Ernesto Camacho), sobre suelos Pardo Sialitico Mullido (Hernández y col., 1999). Los contenidos iniciales de los suelos fueron realizados según ONN (1999 a, b, c) y se presentan a continuación en la Tabla 1, donde se observa que el contenido de fósforo es bajo y el potasio es medio, según el método utilizado (extracción con H_2SO_4, 0.1N) y la materia orgánica obtenida por el método de incineración es baja. Es por ello que el contenido inicial de los nutrientes del sustrato se considera pobre.

Tabla 1. Principales características químicas iniciales de los suelos
Table 1. Principals initial chemical characteristics of soils

mg/100 g de suelo							
pH (KCl)		P_2O5		K_2O		M.O (%)	
1	2	1	2	1	2	1	2
6.1	6.9	12.15	13.20	22.40	15.03	8.39	7.80

(1) Huerto CAN Provincial.

(2) Huerto del productor Ernesto Camacho.

El compost de estiércol vacuno utilizado en el estudio fue analizado antes de ser aplicado y sus principales características químicas se exponen en la Tabla 2, donde se observa que los valores están dentro de los rangos permisibles para que el abono pueda ser utilizado.

Tabla 2. Características químicas del compost de estiércol vacuno
Table 2. Quemical characteristics of bobine manure compost

Compost de estiércol vacuno	(%)			
	N	P	K	M.O
	1.86	0.72	1.02	49.20

Los contenidos de N, P, K, y M.O se determinaron según DNSF (1992).

Los factores estudiados fueron los siguientes: dosis de estiércol vacuno (0; 5; 10 y 15 kg m^{-2}) aplicados en tres momentos de aplicación (al inicio solamente, cada dos cultivos durante la rotación de hortalizas y en cada cultivo) mediante un diseño de bloques al azar con arreglo factorial y cuatro réplicas, en parcelas experimentales que tenían 1 m^2, dejando 0.50 m de área de borde entre cada una de ellas.

El abono orgánico se aplicó en la superficie de cada parcela de acuerdo a la dosis y el momento de aplicación; se incorporó en los primeros 20 cm de profundidad, se mezcló con el suelo y luego se procedió a la siembra.

Para la rotación de hortalizas, los productores tuvieron en cuenta la demanda de los consumidores, por ello se rotó de la forma siguiente: lechuga (*Lactuca sativa* L.), cebollino (*Allium fitulosum*), remolacha (*Beta vulgaris* L.), rabanito (*Rapahanus sativus* L.), acelga (*Barisaca rapa*).

La eliminación de plantas indeseables, el riego y las atenciones fitosanitarias se hicieron de acuerdo a lo establecido por MINAG (1998).

Los análisis finales de los suelos se realizaron según ONN (1999 a, b, c).

Para determinar el rendimiento, en cada cosecha, durante el ciclo de hortalizas se tomó el peso de las mismas por parcelas en kg m^{-2} y se evaluó finalmente el acumulado total de cada ciclo mediante análisis de varianza de clasificación doble y la prueba de rangos múltiples de Duncan para un nivel de significación del 5%, donde hubo significación. Para la determinación de los niveles críticos, se utilizó el rendimiento relativo de cada parcela contra el valor que le correspondía de fósforo, potasio y materia orgánica, esto se hizo utilizando los datos de los dos huertos, (96 datos), según la metodología de Waugh, Cate y Nelson (1974).

Por último, para el análisis económico (Tabla 3) se consideró el precio de venta de los productos (2,20 \$ kg^{-1}). En el caso del costo del estiércol vacuno (\$ kg^{-1}) de acuerdo a los precios vigentes en moneda nacional; para la transportación se estimó en base a \$ 80.00 el viaje de 4 t por 10 km de radio y la aplicación a \$2.00 por cantero de 50 m.

Tabla 3. Costo total de materiales empleados
Table 3. Total materials cost used

Abono Orgánico	Material (\$ kg^{-1})	Transporte (\$ kg^{-1})	Aplicación (\$ kg^{-1})	Total (\$ kg^{-1} m^{-2})
Compost de estiércol vacuno	0.020	0.040	0.020	0.080

El beneficio económico se calculó teniendo en cuenta, la comparación de la dosis óptima y el tratamiento testigo de la investigación, al cual no se le aplicó en ningún momento abono orgánico (Testigo Absoluto), además, la aplicación orgánica que tiene establecido el productor para la producción de hortalizas (Testigo Relativo).

Resultados y discusión

El efecto ejercido por el compost de estiércol vacuno sobre el rendimiento y su momento de aplicación, en el acumulado de cosechas de los dos huertos, se presenta en los cuadros 4 y 5 respectivamente.

Como puede apreciarse en las tablas, la respuesta es por separado al no existir interacción entre los factores, por lo que en ambos huertos la dosis de 10 kg m^{-2} resultó ser la de mayores rendimiento y la aplicación cada dos cultivo durante la rotación, resultó ser la mejor opción estadísticamente. Este resultado coincide con los obtenidos por Caballero y col. (2001 y 2003) en cultivos hortícola de huertos intensivos con el mismo tipo de suelo. También reportan resultados similares con cultivos hortícolas, pero en la modalidad de organopónico y en casa de cultivos protegidos, Carrión y col. (1998), Companioni y col. (1998), Heredia (1998) y Guevara y col. (2004).

Lo ocurrido con el contenido de las principales características químicas del suelo en los dos huertos al finalizar los ciclos hortícolas, se relaciona estrechamente con la respuesta obtenida en los rendimientos (figuras 1 y 2).

Tabla 4. Efecto de la aplicación de compost de estiércol vacuno sobre el rendimiento acumulado en dos huertos
Table 4. Effect of the bovine manure compost application on the accumulated yield in two greengarden

	Rendimiento acumulado (kg m^{-2})	
Dosis (kg m^{-2}) Compost de estiércol vacuno	Huerto CAN Provincial	Huerto Productor Camacho
0	13.89[d]	13.66[c]
5	21.73[c]	24.16[b]
10	34.13[a]	32.15[a]
15	32.44[b]	31.91[a]
Es X	0.6946*	0.6613*

a, b, c, d… Media con letras iguales no difieren a $p \leq 0.05$, según prueba de Duncan.

Los contenidos de fósforo, potasio y materia orgánica aumentan significativamente a partir de la aplicación de 10 kg m^{-2} de compost de estiércol vacuno, sin diferencia significativa con la dosis de 15 kg m^{-2}, lo que evidencia el efecto favorable que este abono causa en las propiedades químicas del suelo, a pesar de las pérdidas de nutrientes que ocurren por la alta frecuencia de riego y la exportación nutrientes por los cultivos.

Tabla 5. Comportamiento del momento de aplicación del compost de estiércol vacuno en el rendimiento de la secuencia de hortalizas
Table 5. Application moment behavior of the bovine manure compost in the sequence vegetable yield

	Rendimiento acumulado (kg m^{-2})	
Momentos de aplicación Compost de estiércol vacuno	Huerto CAN Provincial	Huerto Productor Camacho
Inicio	23.05[b]	23.98[b]
Cada dos cultivos	27.13[a]	26.46[a]
En cada cultivo	26.47[a]	25.96[a]
Es x	0.6015*	0.4717*

a, b, c, d… Media con letras iguales no difieren a $p \leq 0.05$, según prueba de Duncan.

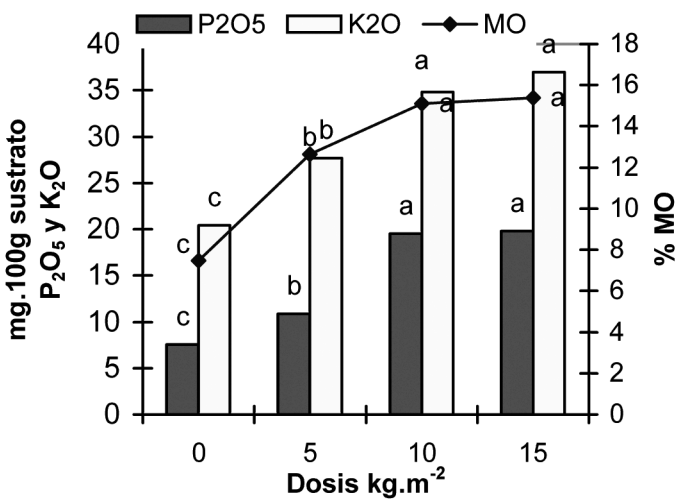


Figura 1. Influencia del compost de estiércol sobre las principales propiedades químicas del suelo en el huerto del CAN.
Figure 1. Manure compost influences on the main chemical properties of the soil in CAN greengarden.

Se debe recordar que en el trópico la meteorización de los materiales orgánicos es mucho más violenta y la duración de los nutrientes en los sustratos no es duradera y poco aprovechada por las plantas. Por otra parte, se están utilizando en la rotación cultivos de ciclos cortos, lo cual justifica aún más lo que sucede en estos sistemas de explotación intensiva de producciones hortícolas. Lo anterior justifica el incremento sostenido de los rendimientos debido a la dosis y el momento de aplicación del compost de

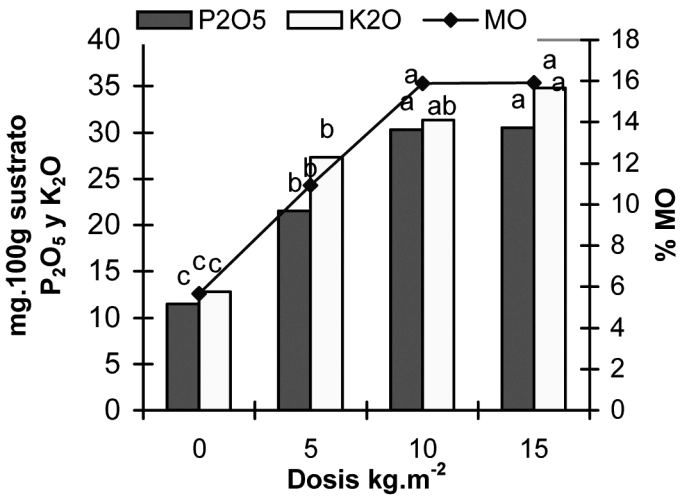


Figura 2. Influencia del compost de estiércol sobre las principales propiedades químicas del suelo en el huerto del productor Camacho.
Figure 2. Manure compost influences on the main chemical properties of the soil in the Camacho greengarden.

estiércol vacuno recomendados en el estudio, ya que su efecto residual cubre dos cultivos, sin deterioro para el suelo.

Resultados similares reportan Pérez y col. (2001), Caballero y col. (2002, 2004) y Chaveli y col. (2006).

En la Tabla 6 se presenta la determinación de los niveles críticos en la modalidad de huertos intensivos, donde se observa que para el caso del P_2O_5, el nivel crítico encontrado fue de 16 mg/100g de suelo con un R^2 significativo de 0.81; al K_2O le correspondió un nivel crítico de 20 mg/100g de suelo con un R^2 significativo de 0.74, mientras que la materia orgánica tuvo un R^2 significativo de 0.79 con un nivel crítico de 11.00%.

Teniendo en cuenta la respuesta obtenida en los rendimientos y el valor de los niveles críticos determinados se recomienda lo siguiente:

Todo huerto intensivo que su suelos sea Pardos Sialiticos Mullido sin Carbonatos, y que sus valores de fósforo, potasio y materia orgánica se encuentren por debajo de 16 mg/100g de suelo, 20 mg/100g de suelo y 11 % de materia orgánica respectivamente, se le debe aplicar la dosis de 10 kg m^{-2} de compost de estiércol vacuno cada dos cultivos durante la rotación para obtener rendimientos sostenidos por encima de los 30 kg m^{-2}.

Caballero y col. (1999) reportan un nivel crítico de materia orgánica de 12 % en un suelo Pardo Sialitico (Hernández y col., 1999), valor casi coincidente al obtenido en este estudio. Con respecto al fósforo y al potasio no se tiene referencia alguna de que se hayan determinado hasta el momento para estas condiciones.

En la Tabla 7 se expone el beneficio económico obtenido en la modalidad de huertos intensivos, donde se observa que en el huerto del CAN provincial el beneficio fue de 34.93 \$ m^{-2} $ciclo^{-1}$ para el caso del testigo absoluto y 23.93 \$.m^{-2} $ciclo^{-1}$ cuando se comparó contra el testigo relativo. En el caso del Huerto del productor Camacho, ascendió a

Tabla 6. Niveles críticos de P_2O_5, K_2O y Materia Orgánica en suelo de Huertos Intensivos
Table 6. Critical levels of P2O5, K2O and Organic Matter in greengarden soils

Indicador	P_2O_5		K_2O		MO (Método Incineración)	
	mg/100 g de suelo		mg/100 g de suelo		%	
	N.C	R^2	N.C	R^2	N.C	R^2
Niveles Críticos y R^2	16.00	0.81*	20.00	0.74*	11.00	0.79*

Metodología de Waugh, Cate y Nelson (1974).

Tabla 7. Beneficio económico obtenido por la aplicación de la dosis óptima en Huertos Intensivos
Table 7. Economic benefit obtained by the application of the good dose in intensive greengarden

Huertos Intensivos	Tratamiento	Rdto (kg m^{-2})	Valor de la prod. (kg m^{-2})	Costo Total* ($ m^{-2})	Valor de prod. final ($ m^{-2})	Beneficio ($ m^{-2} $ciclo^{-1}$)
Huerto CAN Provincial	Testigo Absoluto	13.89	30.56	–	30.56	–
	Testigo Relativo	18.89	41.56	–	41.56	–
	Dosis óptima	34.13	75.09	9.60	65.49	34.93 A
						23.93 R
Huerto del productor Camacho	Testigo Absoluto	13.66	27.32	–	27.32	–
	Testigo Relativo	18.66	41.05	–	41.05	–
	Dosis óptima	32.15	70.73	9.60	61.13	33.81 A
						20.08 R

* Costo Total por m^2 referido en Tabla 4.
A: Comparación de dosis óptima con Testigo Absoluto.
R: Comparación de dosis óptima con Testigo Relativo.

33.81 y 20.08 $ m^{-2} $ciclo^{-1}$ para el testigo absoluto y relativo respectivamente. Todo lo anterior demuestra que el alza en los rendimientos es determinante, pues el costo del abono orgánico es muy bajo, al igual que el de transportación y aplicación, para justificar el beneficio obtenido.

Conclusiones

La aplicación de 10 kg m^{-2} de compost de estiércol vacuno, aplicado cada dos cultivos durante un ciclo rotativo de hortalizas, en la modalidad de huertos intensivos, incrementan los rendimientos 30 kg m^{-2} $ciclo^{-1}$, aumentando al doble la producción de hortalizas.

Los niveles críticos determinados en suelos Pardos Sialitico en huertos, fueron: 16 mg $(100g)^{-1}$ de P_2O_5, 20 mg $(100g)^{-1}$ de K_2O y 11 % materia orgánica.

El incremento de los rendimientos producto de la dosis y el momento de aplicación empleadas, alcanzó beneficios económicos por encima de 30.00 $ m^{-2} $ciclo^{-1}$

Bibliografía

Abad M, 1997. Sustratos hortalizas. En: Curso de Agricultura Urbana. INIFAT- AECI. La Habana, Cuba: 13-18.

Arias E, N López y A Guerrero, 1996. Sustratos para sistemas de organopónicos, alternativas para el mantenimiento de sus propiedades. IV Jornada Científica del Instituto de Suelos y II Taller Nacional sobre Desertificación. Resumen. p 36.

Caballero R, 1999. Efecto de los abonos orgánicos en la explotación de huertos intensivos. Tesis presentada en opción al grado de Master en Fertilidad del Suelo. 12 p.

Caballero R, Pérez D, Vento M, Font L, Chaveli P, Rodríguez D y Valenciano M, 2003. Generalización de la tecnología de fertilización orgánica en los huertos intensivos del municipio Camagüey. Informe final del proyecto Territorial. 0908007. Instituto de Suelos. Dirección provincial Camagüey. 25 p.

Caballero RJ, Gandarilla D, Pérez D, Rodríguez P, Chaveli M, Vento y M González, 2004 Mejoramiento de la disponibilidad de abonos orgánicos en la Granja Urbana del municipio de Camagüey. XIV Congreso Científico del INCA. Programa y Resúmenes. 18 p.

Carrión M, Companioni N, Peña E, González R, Cruz A y Quiñónez O, 1996. Sustratos para organopónicos. Resultados preliminares. VII jornada Científica. Talleres. INIFAT. MINAG. 55 p.

Carrión M, Companioni N, Peña E, González R, 1998. Evaluación de la calidad de los sustratos. En: Memorias del 1er Encuentro Internacional sobre Agricultura Urbana y su impacto en la alimentación de la comunidad. INIFAT. La Habana Cuba. p. 24-29.

Chaveli P, Caballero R, Corrales I, López P y Rodríguez D, 2006. Informe final de proyecto. Empleo del residual de biogás en la fertilización de algunos cultivos. Dirección provincial de Suelos, Camagüey. p. 11-18.

Childe VG, 1968. Los orígenes de la civilización. Ed. Revolucionaria. Instituto del Libro. La Habana, Cuba. p. 295.

Companioni N, Rodríguez A, Carrión M, Alonso RM, Ojeda Y, Peña E y Pozo JL, 1997. La agricultura urbana. INIFAT. Agencia Española de Cooperación Internacional. La Habana, p. 1-12.

Companioni N, Rodríguez NA, Carrión M, Alonso RM, Peña E, Ojeda Y, Peña E y Pozo JL, 1998. Agricultura Urbana. Su desarrollo y principales componentes. Compendio sobre Agricultura Urbana. Modalidad: Organopónicos y huertos intensivos. INIFAT- UNICA. Ciego de Ávila. Cuba. p. 2-8.

DNSF. Dirección Nacional de Suelos y Fertilizantes. 1992. Metodología de análisis de muestras de sustratos orgánicos.

Guevara A, González M, Pérez D, Peña E, Hartman T y Bardanca T, 2004. Aplicaciones de abonos orgánicos y fertilizantes minerales para hortalizas en casas de cultivos protegidos. XIV Congreso Científico del INCA. Programa y Resúmenes. p. 27.

Heredia C, Machado JM, Recompensa C y Álvarez D, 1998. Producción de hortalizas todo el año. II Vías alternativas para producir hortalizas en condiciones de Agricultura Urbana. XI Seminario Científico. INCA. Programas y Resúmenes. 17- 20 Nov. p. 85.

Hernández A, Pérez JM, Marsán R, Morales M, López R, 1999. Correlación de la Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba con Clasificaciones Internacionales (SOIL TAXONOMY y FAO-UNESCO) y Clasificaciones Nacionales (2da. Clasificación Genética y Clasificación de Series de Suelos).

MINAG, 1998. Instructivo Técnico para Organopónicos MINAG-INIFAT. La Habana, Cuba. 78 pp.

ONN. Oficina Nacional de Normalización, 1999a. Norma Cubana NC ISO 10309. Determinación del pH (KCl).

P_2O_5 y K_2O b. Norma Cubana NC 52. Determinación de las formas móviles de P_2O_5 y K_2O.

ONN. Oficina Nacional de Normalización. 1999 c. Norma Cubana NC 51. Determinación de M.O.

Pérez D, Gandarilla JE y Curbelo R, 1995. El deterioro del sustrato en canteros de organopónicos por cosechas sucesivas. En: Resúmenes 1er Taller Nacional sobre Desertificación. Guantánamo, Febrero. p. 59.

Pérez D, Gandarilla JE, Vento M, Curbelo R, Guerra A y Caballero R, 1999. Alternativas para mantener la fertilidad de los sustratos en organopónicos. XI Seminario Científico. INCA. Resúmenes. p. 17- 20 Nov. p. 209.

Pérez D, Gandarilla JE, Curbelo R, Caballero R y Rodríguez D, 2001. Alternativas orgánicas para mantener rendimientos estables en organopónicos. Centro Agrícola. 2: 76-79.

Waugh DL, Cate RB and Nelson LA, 1974. Modelos discontinuos para una rápida correlación, interpretación y utilización de los datos de análisis de suelo y la respuesta a los fertilizantes. Boletín Técnico 7, North Carolina State University (traducción al español).

(Aceptado para publicación el 13 de julio de 2011)

Efecto del tratamiento de semillas con láser de baja potencia, sobre el crecimiento y rendimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*)

A. Álvarez*, R. Ramírez, L. Chávez, Y. Camejo, L. Licea, E. Porras y B. García

Centro de Investigaciones, Servicios y Tecnologías Ambientales de Granma, Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Carretera vía Manzanillo, km 16 1/2, Bayamo, Granma. Cuba
* Autor para correspondencia: alexanderf@dimitrov.cu

Resumen

Se estudió la influencia del tratamiento de semillas con radiación láser de baja potencia sobre algunos parámetros fisiológicos y el rendimiento del híbrido de tomate HA3019 en condiciones de cultivo protegido. Las semillas se irradiaron con un equipo láser de He-Ne con potencia de 25 mW y diferentes periodos de exposición: 5, 10, 20, 30 y 60 segundos, empleando semillas no tratadas como control. Se evaluó el porcentaje de germinación (%), supervivencia (%), altura de las plantas (mm), longitud de la raíz (mm), diámetro del tallo (mm), diámetro medio polar de los frutos (mm), diámetro medio ecuatorial de los frutos (mm), masa promedio de los frutos (g) y rendimiento por planta (kg.planta-^{1}). Los resultados mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en los indicadores; altura de las plantas (50%), longitud de la raíz (13%), diámetro del tallo (17%), diámetro medio ecuatorial (7%), masa promedio de los frutos (13%) y rendimiento por plantas (67%), respecto al control. Estos resultados corroboran el efecto estimulante de la radiación láser de baja potencia en el crecimiento y rendimiento de las plantas.

Palabras clave: Hortalizas, cultivo protegido.

Abstract
Efect of seed treatment with low potency laser on the growth and yield in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.)

The influence of seed treatment with low-power laser radiation on some physiological parameters and yield of tomato hybrid HA3019 protected cultivation conditions. The seeds were irradiated with a laser He-Ne 25 mW power at different exposure periods 5,10, 20, 30 and 60 seconds, using untreated seeds as controls. We evaluated the germination percentage (%), survival (%), plant height (mm), root length (mm), stem diameter (mm), polar average diameter (mm) ecuatorial mean diameter (mm), mean fruit mass (g) and yield per plant (kg.plant-1). The results showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in the indicators of plants height (50%), root length (13%), stem diameter (17%), equatorial mean diameter (7%), mean fruit mass (13%) and yield per plant (67%), compared to control. This confirms the stimulating effect of low power laser radiation on growth and yield of plants.

Key words: Vegetables, protected cultivation.

Introducción

A escala global, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) constituye uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia por su extensión, demanda y formas de consumo (Moya *et al*., 2005). A pesar de que el tomate es uno de los cultivos más estudiados en Cuba, los rendimientos que se obtienen son bajos debido a la influencia de las desfavorables condiciones climáticas que prevalecen en esta región, que distan mucho de sus exigencias ecológicas. En tal sentido, no se cuenta con variedades totalmente adaptadas a estas condiciones, lo que ha motivado la introducción de híbridos F1 en casas de cultivos protegidos como una alternativa para incrementar los rendimientos y la calidad de los frutos (Moya *et al*., 2005; Álvarez *et al*., 2003). Las casas de cultivos protegidos se utilizan en países de clima tropical y son espacios cerrados y techados, diseñados con efecto sombrilla para refrescar la temperatura y proteger a los cultivos de otros factores climáticos adversos y de algunos factores bióticos.

Las casas de cultivos protegidos constituyen una tecnología muy promisoria para extender el calendario de producción y lograr una alta productividad y calidad de las hortalizas durante todo el año en condiciones tropicales (Gómez *et al*., 2000). Por ejemplo, los rendimientos promedios que se alcanzan en las casas de cultivos protegidos de la provincia de Granma (Cuba) se encuentran en el orden de las 140 $t.ha^{-1}$ (Toledo, 2009), sin embargo, el rendimiento potencial de estos híbridos supera las 270 $t.ha^{-1}$, cuando se desarrolla bajo las condiciones climáticas de países templados y de 220 $t.ha^{-1}$, en los tropicales. Esta problemática sugiere la necesidad del empleo de métodos estimulantes que contribuyan a minimizar los efectos adversos del clima tropical y a incrementar los rendimientos agrícolas en estos híbridos, sobre todo si se considera el alto precio de éstas semillas en el mercado mundial (Ramírez, 2006 y Aladjadjiyan, 2007).

En Cuba, en el último decenio se han intensificado las investigaciones y el uso de los métodos físicos estimulantes en la agricultura, como una alternativa viable para incrementar los rendimientos y la calidad de las cosechas, dentro de la política de la agricultura sostenible y aprovechando además, la experiencia acumulada por algunos países del mundo como Rusia, Bulgaria, Hungría, la India y Canadá, en el tratamiento de semillas con bajas dosis de radiaciones ionizantes, campos electromagnéticos, ultrasonido y láser (Ramírez, 2006 y De Souza *et al*., 2006).

Se ha demostrado que la luz láser de baja de baja potencia induce cambios electroquímicos y bioquímicos en las semillas tratadas, con un posterior incremento de la intensidad de la respiración, el crecimiento y rendimiento de las plantas (Muszyñski y Gladyszewska, 2008).

De esta forma, el tratamiento irradiativo presiembra de las semillas con luz láser ha contribuido a incrementar el rendimiento de diferentes especies de hortalizas y cereales (De Souza *et al*., 2006).

El objetivo de este trabajo es estudiar la fotosensibilidad a la radiación láser de baja potencia, en semillas híbridas del cultivar de tomate HA3019 y determinar las dosis estimulantes del crecimiento y rendimiento en casas de cultivos protegidos del municipio Bayamo, provincia Granma, Cuba.

Materiales y métodos

Las investigaciones sobre el efecto y la selección de dosis estimulantes de rayos láser en plantas de tomate se desarrollaron en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", de la provincia Granma,

perteneciente al Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente y en el sistema de casas de cultivo protegidos de "La Pupa", perteneciente al Ministerio de la Agricultura, en esta provincia; en el periodo comprendido entre el 21 de mayo de 2008, hasta el 21 de septiembre de 2008.

Se emplearon semillas del cultivar híbrido de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), HA3019" provenientes de la firma israelí HAZERA. El contenido de humedad de las semillas fue de un 12-13% y el porcentaje de germinación de 97%.

Para el tratamiento de las semillas se empleó un equipo láser de He-Ne con una potencia de 25 mW, comprendido en la zona roja del espectro de luz (λ = 632.8 nm), una mancha de luz de aproximadamente 10 cm², con una densidad de potencia de 2.5 mW/cm².

Las semillas se irradiaron durante períodos de exposición de 5, 10, 20, 30 y 60 segundos, utilizando semillas no tratadas como control. Se utilizaron un total de 80 semillas por cada tratamiento. El tratamiento se realizó en horas de la mañana, a una temperatura de 25ºC según recomendaciones de Guardia *et al*. (1995).

El experimento contó con dos fases experimentales, la primera se desarrolló en una casa dedicada a la producción de posturas en cepellón sin malla sombreadora Las posturas son plántulas que se obtienen de las semillas sembradas, cuando alcanzan los parámetros de calidad, se trasplantan hacia otra casa de cultivo y se siembran directamente en tierra. Se utilizó como sustrato: humus de lombriz 60%, turba rubia 30% y cascarilla de arroz 10%. Se utilizaron 5 bandejas de 4.0 x 4.0 x 7.0 cm, con un volumen de alvéolos de (45.0 cm^3), cada una con un total de 150 alvéolos. Las variantes experimentales se distribuyeron de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado. Durante este período, el riego se aplicó según el Instructivo técnico para casa de cultivos protegidos (Casanova *et al*, 1999). Se evaluó el porcentaje de germinación (%) a los 7 días después de la siembra, de forma visual mediante el conteo de las plántulas germinadas. La supervivencia (%) se determinó a los 15 días después de la siembra. La altura de la planta (mm) y la longitud de la raíz principal (mm) se evaluaron al momento del trasplante, en 10 plántulas por cada réplica y un total de 40 plántulas por tratamiento con el empleo de una regla graduada en mm. El diámetro del tallo (mm) se evaluó al momento del trasplante en 10 plántulas por réplicas y un total de 40 plántulas por tratamientos con el empleo de un pie de rey mecánico cuya precisión es de 0.05 mm. Las evaluaciones de estos indicadores se realizaron según la metodología descrita por (Miranda, 2003) y los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje respecto al control, como una medida de la fotosensibilidad en las plantas.

La segunda fase experimental se desarrolló en una casa dedicada a la producción de frutos del modelo tropical A-12 (Tipología 2) de 540 m², sobre un suelo Fluvisol típico, lavado, profundo, medianamente humificado, poca erosión, 70cm de profundidad efectiva, llano y textura de arcilla loamosa (Hernández, 1999). Se estableció un marco de plantación de 1.04 por 0.40 m. Las variantes experimentales se distribuyeron cumpliendo un diseño de bloques al azar con 4 réplicas por tratamiento de 20 plantas cada una. Durante esta etapa el riego se realizó según el instructivo técnico para casa de cultivos protegidos (Casanova *et al*, 1999). En la madurez fisiológica se etiquetaron 10 plantas por réplica en cada tratamiento. Se evaluó el diámetro medio polar (mm) y el diámetro medio ecuatorial (mm), mediante mediciones realizadas a los frutos durante toda la cosecha con el empleo de un pie de rey mecánico, cuya precisión es de 0.05 mm. También se evaluó la masa promedio de los frutos (g) y el rendimiento por planta en (Kg.planta-^{1}), mediante pesadas realizadas durante toda la cosecha, con el empleo de una balanza técnica.

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para la normalidad de los datos y la prueba de Bartlett para la homogeneidad de varianzas (Yandell, 1997). Los datos se evaluaron por un análisis de varianza de clasificación doble ($p<0.05$) para determinar los efectos de la radiación láser de baja potencia comparados con el control. Las comparaciones múltiples de medias de los tratamientos, se realizaron con la prueba de Newman-Keuls (Stell y Torrie, 1992). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete "Statistics for Windows".

Resultados y discusión

En esta experiencia el efecto de la luz láser no provocó cambios significativos ($p\leq0.05$) en la germinación de las semillas de la variedad estudiada. Este comportamiento pudiera estar relacionado, por una parte, con el alto potencial germinativo que tenían las semillas irradiadas (97%) y por otra, con la baja potencia de la fuente y el corto tiempo de exposición a la irradiación. No obstante, como se observa en la tabla 1, a partir de los 30 segundos de exposición a la irradiación se produce un ligero decrecimiento del porcentaje de germinación de las semillas, que pudiera ser más severo (significativo) si se incrementara el tiempo de irradiación.

En correspondencia con estos resultados numerosos autores (Creanga *et al*., 2002; Ramírez, 2006; Ramírez *et al*., 2006; De Souza *et al*., 2006 y Ciupak *et al*., 2007) han señalado un comportamiento similar al tratar semillas de hortalizas con métodos físicos estimulantes como son las bajas dosis de radiaciones ionizantes, los campos magnéticos y el láser de baja potencia. Estos autores plantean que las semillas con alto poder germinativo reaccionan de forma débil al tratamiento con métodos físicos y que la estimulación de este indicador, generalmente se logra cuando las semillas presentan problemas de latencia o están sometidas a condiciones estresantes que retrasan o inhiben su germinación.

Con relación a la supervivencia de las plántulas (Figura 2), no se constataron diferencias significativas ($p\leq0.05$) en la variedad estudiada con el incremento de los tiempos de exposición, lo que muestra que tanto la potencia de la fuente de irradiación como los tiempos de exposición no indujeron cambios fisiológicos, ni genéticos severos que conllevaran a la muerte de las plantas.

Al respecto, Al-Safadi y Simon, (1996) y Kathleen y Donald, (2001) informaron que cuando la exposición a la luz láser es muy prolongada disminuye significativamente la supervivencia y se incrementa la probabilidad de inducción de mutaciones. Es decir, existe una

Tabla 1. Efecto del tratamiento de semillas con rayos láser sobre el porcentaje de germinación y supervivencia en el híbrido de tomate HA3019
Table 1. Effect of seed treatment with laser on the percentage of seed germination and the survival in the hybrid tomato HA3019

Variables	Tiempos de exposición (s)						ESx
	0	5	10	20	30	60	
Germinación (%)	97	100	100	99	100	96	± 0,444
Supervivencia (%)	100	99	98	100	99	98	± 0,255

No hubo diferencia significativa de los tratamientos con respecto al control para ($p\leq0,05$).

correlación negativa de la supervivencia con el incremento de las dosis de irradiación en diversos cultivos agrícolas. Calabrese y Baldwin, (2003) plantearon que las bajas dosis y potencias de irradiación provocan respuestas beneficiosas en los organismos vivos mientras las altas deprimen o inhiben todas sus funciones vitales hasta provocar la muerte. No obstante, es necesario señalar que en el presente trabajo se empleó un equipo de irradiación láser de He-Ne de baja potencia (25 mW) comprendido en la zona roja del espectro de luz (λ = 632.8 nm) y una potencia de dosis suficientemente baja (25 mW) que garantiza, solamente, la posible ocurrencia de cambios fisiológicos en las plantas provenientes de las semillas tratadas. Por tanto, los valores de supervivencia muestran que los tiempos de exposición y la potencia de la fuente pudieran ser adecuados para estimular determinados procesos fisiológicos en las plantas de tomate, con baja probabilidad de inducir mutaciones.

En los tres indicadores del crecimiento evaluados (Figuras 1, 2, 3) observamos un intervalo de estimulación con tiempos de irradiación inferiores a los 30 segundos.

La altura de las plantas mostró (Figura 1) valores de estimulación significativos ($p \leq 0.05$) con respecto al control sin irradiar, con la presencia de dos picos fundamentales de estimulación, uno con un tiempo de exposición de 5 segundos (31%) y el otro a los 20 segundos con un incremento en la altura de las plantas de más de 50% con respecto al control. A partir del intervalo de estimulación, con tiempos de exposición superiores a los 30 segundos se manifiesta una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de la altura de las plantas.

Un comportamiento similar se observó en el indicador longitud de la raíz (Figura 2), con la diferencia de que sólo se manifestó un pico de estimulación que correspondió al tratamiento con 20 segundos de exposición de las semillas (13%), a la radiación láser. Las do-

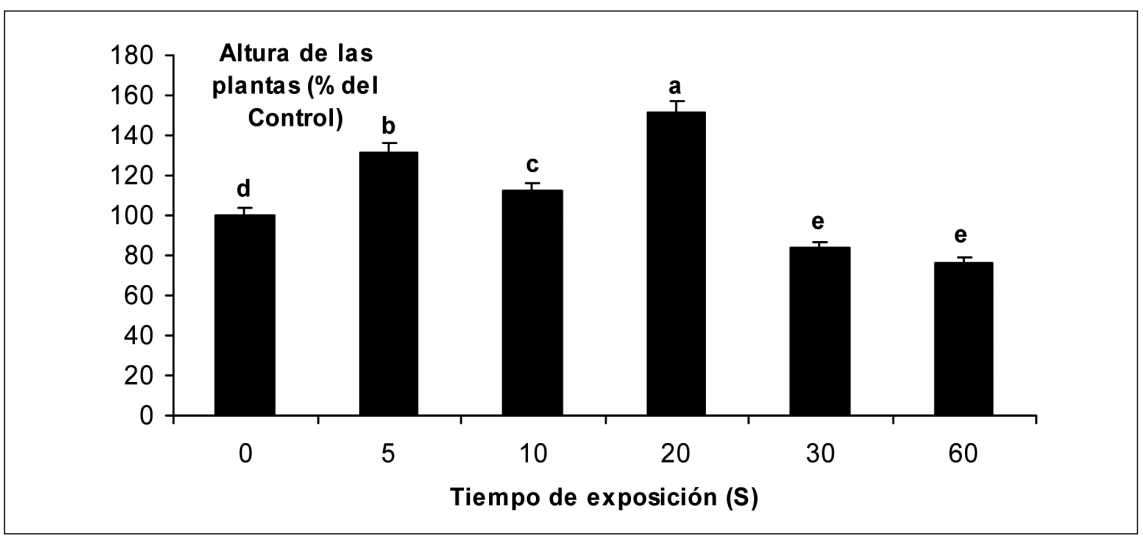


Figura 1. Influencia de la irradiación láser en la altura de las plantas del híbrido de tomate HA3019. (En la figura, barras con letras desiguales presentan diferencias significativas respecto al control).
Figure 1. Influence of laser irradiation on plant height of tomato hybrid HA3019. (In the figure, different letter bars significative differences respect to the control).

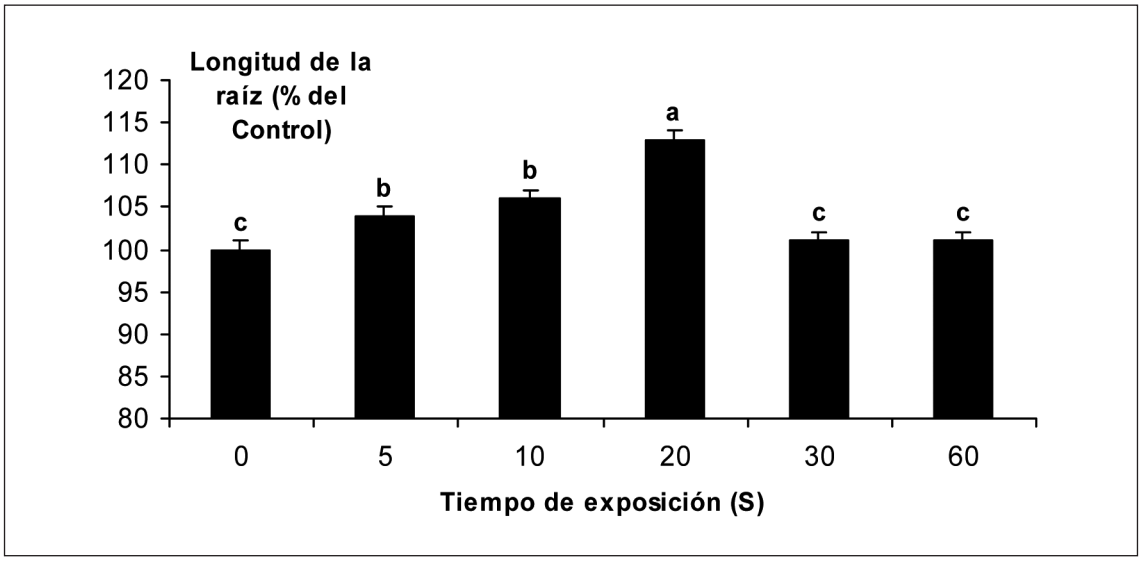


Figura 2. Influencia de la irradiación láser en la longitud de la raíz del híbrido de tomate HA3019. (En la figura, barras con letras desiguales presentan diferencias significativas respecto al control).
Figure 2. Influence of laser irradiation on root length of tomato hybrid HA3019. (In the figure, different letter bars significative differences respect to the control).

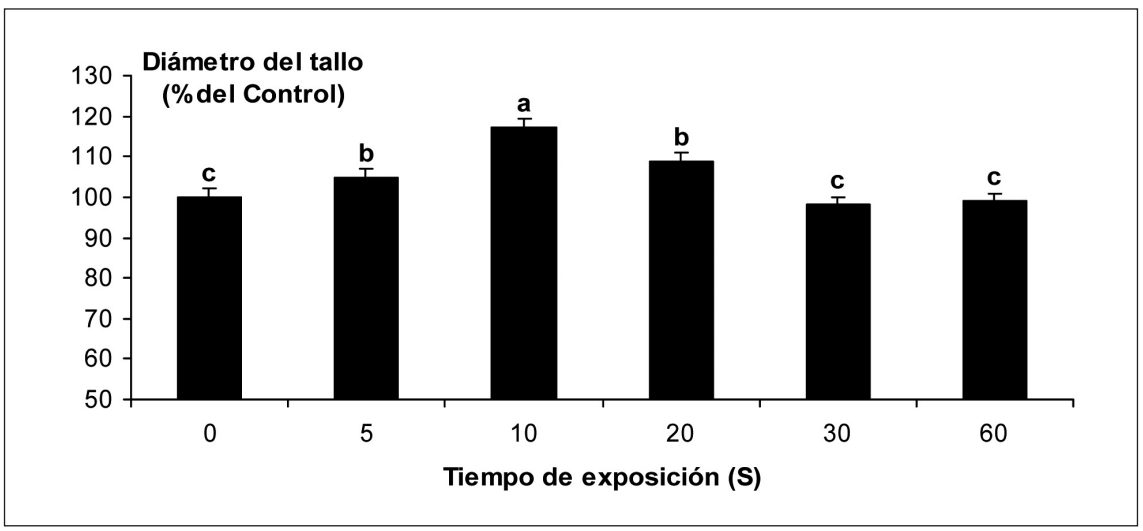


Figura 3. Influencia de la irradiación láser en el diámetro del tallo del híbrido de tomate HA3019. (En la figura, barras con letras desiguales presentan diferencias significativas respecto al control).
Figure 3. Influence of laser irradiation on the stem diameter of tomato hybrid HA3019. (In the figure, different letter bars significative differences respect to the control).

sis de 5 y 10 segundos también mostraron una estimulación significativa ($p \leq 0.05$) de este indicador con relación al control; los tiempos de exposición superiores a 20 segundos no provocaron cambios significativos en la longitud la raíz.

En el diámetro del tallo (Figura 3) se constató la existencia de una zona de estimulación en la curva de fotosensibilidad láser, con valores significativos ($p \leq 0.05$) en el rango de dosis comprendido entre 5-20 segundos. La dosis más efectiva se obtuvo a los 20 segundos de exposición a la luz láser que conllevó a incrementos de 17% (3.86 mm) en este indicador. Para tiempos superiores de exposición no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

Con relación a este indicador, es preciso señalar que todas las plantas evaluadas, incluyendo las del control superaron los 3 mm en el grosor del tallo, durante el trasplante; lo que es considerado (Casanova, 2003) un requisito indispensable para garantizar un adecuado establecimiento de la plantación.

Un comportamiento similar lo obtuvo Aladjadjiyan, (2007), al tratar semillas de tomate con radiación láser de baja potencia, donde logró un incremento del crecimiento superior a un 25%. Este autor plantea que la estimulación depende de la longitud de onda, de la fuente de irradiación y del tiempo de exposición.

También, Cepero *et al*., (2002) y Chen *et al*., (2005b), obtuvieron resultados similares al tratar semillas de hortalizas con radiación láser de baja potencia. Estos autores plantean que la existencia de dos picos de estimulación en determinado indicador puede estar relacionada con la interacción de los factores físicos con el material biológico, la cual posee un carácter probabilístico. De forma general, las curvas dosis-efecto no se caracterizan por tener un comportamiento monótono (cuando se observa una sola zona de estimulación para determinado indicador), ya que la irradiación láser de baja potencia tiene la capacidad de provocar efectos fisiológicos que se manifiestan desde las etapas iniciales del crecimiento de las plántulas; en correspondencia con los tiempos de exposición, la potencia de la fuente de irradiación y la influencia de algunos factores externos.

Este incremento observado en los indicadores del crecimiento de las plantas por efecto del tratamiento láser pudiera estar relacionado con la influencia que ejerce este agente físico sobre la actividad enzimática, fundamentalmente en las enzimas polifenoloxidasas, superóxido dismutasas y catalasas que juegan un papel importante en el crecimiento de las plantas (Chen *et al*., 2005a).

Los resultados mostraron que el tratamiento de las semillas con rayos láser provocó un efecto estimulante significativo ($p \leq 0.05$) en el rendimiento y algunos de los componentes evaluados, en el híbrido de tomate HA3019 (Tabla 2). El diámetro medio ecuatorial de los frutos de tomate mostró en todos los tratamientos aplicados (T1-T5) diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con relación al control. Los tratamientos más estimulantes fueron T1 (5 s) y T3 (20 s) que incrementaron este indicador en un 7%. También la masa promedio de los frutos experimentó incrementos significativos en los tratamientos T1-T2 y T3 con valores máximos de 13% en las plantas provenientes de las semillas tratadas durante 20 segundos (T3) con la luz láser. No obstante, en el diámetro medio polar de los frutos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (T1-T5) y el control.

El rendimiento agrícola medio en las plantas procedentes de los tratamientos durante 10 y 20 segundos alcanzó valores de 37 y 67% superiores al control, los tratamientos T4 y T5 no mostraron diferencias significativas con relación al control.

Estos valores de estimulación coinciden con los informados por Ramírez *et al*., (2000), al

Tabla 2. Efecto del tratamiento de semillas con rayos láser sobre el rendimiento y algunos de sus componentes en el híbrido de tomate HA3019
Table 2. Effect of seed treatment with laser on performace and certain components in the hybrid tomato HA3019

Tiempo de exposición	DMP (mm)	DME (mm)	%	MPF (g)	%	RPP (Kg.plan-1)	%
T0	59.60 a	64.50 e	–	166.20 d	–	2.59 d	–
T1 (5 s)	60.00 a	68.90 a	107	173.42 bc	104	3.29 bc	127
T2 (10 s)	59.30 a	67.80 b	105	178.27 b	107	3.56 b	137
T3 (20 s)	60.20 a	69.00 a	107	188.52 a	113	4.33 a	167
T4 (30 s)	59.20 a	66.10 c	102	169.23 cd	102	2.73 cd	105
T5 (60 s)	59.90 a	66.00 d	102	169.11 d	102	2.67 d	103
ESx	± 0.114	± 0.094		± 3.14		± 0.027	

En las columnas medias con letras desiguales presentan diferencias significativas para (p≤0. 05) por la prueba paramétrica de Newman-Keuls.
In the columns, different letter means significative differences (p≤0.05) for the Newman-Keuls parametric test.
DMP: diámetro medio polar.
DME: diámetro medio ecuatorial.
MPF: masa promedio de los frutos.
RPP: rendimiento promedio por planta.

tratar semillas de hortalizas con métodos físicos, donde lograron un incremento de más de un 50% en el rendimiento y en algunos de sus componentes.

Wilczek y Fordoński, (2007) observaron un incremento significativo del rendimiento agrícola superior al 23%. Estos autores valoraron que el efecto estimulante tiene una estrecha relación con el incremento de la intensidad de la fotosíntesis y la transpiración, que se produce en las plantas provenientes de semillas tratadas con la luz láser de baja potencia.

Resultados similares fueron obtenidos por Cwintal y Olszewski, (2007) al tratar semillas secas de seis variedades de alfalfa con un láser de baja potencia y observar valores superiores en el rendimiento agrícola, la intensidad de la fotosíntesis, acumulación de biomasa y transpiración, con relación al control.

También Vasilevski y Bosev (2009) obtuvieron una estimulación del rendimiento en diferentes hortalizas por efecto de la luz láser de baja potencia. Así, en tomate, se estimuló el rendimiento de 20-24%, en pimiento al 13%, en pepino un 15%, en cebolla al 15,5% y en frijol un 27%.

Por otro lado, Gladyszewska y Lublin, (2006) señalaron resultados similares en plantas de trigo y centeno, al utilizar un láser de He-Ne con una potencia de 4 $mW.cm^{-2}$.

Al respecto Muszyñski y Gladyszewska, (2008) plantean que la luz láser induce cambios electroquímicos y bioquímicos en las semillas tratadas que posteriormente conllevan a efectos estimulantes durante el crecimiento y rendimiento de las plantas.

Se plantea que el efecto estimulante de la radiación láser de baja potencia está relacio-

nado con el aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, producto a ello se acelera la entada de agua y de oxígeno (Podlesny, Misiak y Koper, 2001).

Otros autores como Chen *et al*. (2005a), plantean que la luz láser incrementa la actividad enzimática, en primer lugar de las enzimas hidrolíticas y de oxidación-reducción, por lo que se garantiza el acceso más rápido y completo de las sustancias nutritivas al embrión, la aceleración del ritmo de la división celular y la activación y estimulación de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, creándose la base para lograr una mayor productividad en ellas.

Bibliografía

Aladjadjiyan A, 2007. The use of physical methods for plant growing stimulation in Bulgaria. *Journal Central European Agricultura*. 8(3): 369-380.

Al-Safadi B y Simon PW, 1996. Gamma irradiation-induced variation in carrots (*Ducus carota* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 599-603.

Álvarez M, Moya C, Florido M y Plan, D, 2003. Resultados de la mejora genética del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y su incidencia en la producción hortícola de Cuba. *Cultivos Tropicales*. 24(2): 63-70.

Calíbrese EJ y Baldwin LA, 2003. 'Hormesis: the dose-response revolution', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43: 175-197.

Casanova A, 2003. Manual para la Producción Protegida de Hortalizas. La Habana: Editorial Liliana.

Casanova A, Gómez O, Depestre T, Igarza A, León M, Santos R, Chailloux M, Hernández JC y Pupo FR, 1999. Guía Técnica para la producción protegida de hortalizas en casas de cultivos tropical con efecto sombrilla. La Habana, I.I.H. "L. Dimitrova".

Cepero A, Mesa R, García M y Suárez J, 2002. Efecto de la radiación láser en semillas de *Albizia lebleck*. I Fase de semillero. *Pastos y Forrajes,* 25: 181-187.

Chen YP, Liu YJ, Wang XL, Ren ZY y Yue M, 2005a. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *Isatis indigotica*. *J. Integrat. Plant Biol*. 47(7): 849-855.

Chen YP, Yue M y Wang XL, 2005b. Influence of He-Ne laser irradiation on seeds thermodynamic parameters and seedlings growth of *Isatis Indigotica*. *Plant Sci*. 168(3): 601-606.

Ciupak A, Szczurowska I, Gladyszewska B, Pietruszewski S, Lublin, 2007. Impact of laser light and magnetic field stimulation on the process of buckwheat seed germination. *AGRIS record*. 10 (2): 1-10.

Creanga IA, Harten C, Mocanasu D y Mihaltescu D, 2002. Gamma radiation effects on catalase and assimilatory pigments in *False acasia* seedling grown on forestry nursery. *Romanian Biotechnological letters*. 7(5): 10-15.

Cwintal M y Olszewski J, 2007. Influence of pre-sowing laser stimulation of seeds on photosynthesis and transpiration intensity and on yielding of alfalfa. *Acta Agrophysica*. 9(2): 345-352.

De Souza A, García D, Sueiro L, Gilart F, Licea L y Porras E, 2006. Pre-sowing magnetic treatments of tomato seeds increase the growth and yield of plants. *Bioelectromagnetics.* 27: 247-257.

Gladyszewska V y Lublin B, 2006. Pre-sowing laser biostimulation of cereal grains. *Technical Sciences*. 9(1): 33-38.

Gómez O, Casanova A, Laterrot H y Anaïs G, 2000. Mejora genética y manejo del Cultivo del Tomate para la producción en el Caribe. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". La Habana. 159 pp.

Guardia L, Rassi J, Labrada A, Casate R, De Souza A y Tamayo E, 1995. Curva de fotosensibilidad láser en cultivos hortícolas. *El láser en la agricultura*. Chess Editores, México; 32 pp.

Hernández A, Pérez JM, Bosch D y Rivero L, 1999. Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. AGRINFOR, 64 p.

Kathleen R y Donald T, 2001. Irradiation effects on alfalfa seed germination and yield ratio and on alfalfa sprout microbial keeping quality. Eastern Regional Research. *Agricultural Research Service*, 17 pp.

Miranda E, 2003. Efectos de la inoculación del EcoMic® y icoFert® en el cultivo de *Nicotiana tabacum* (Lin.), Var. Criollo 98 bajo condiciones cepellón. Trabajo de diploma. Universidad de Granma, Cuba, 35 pp.

Moya C, Álvarez M, Plana D, Florido M, Lawrence CBJ, 2005. Evaluación y selección de nuevas líneas de tomate (*Licopersicon esculentum* Mill.) con altos rendimientos y frutos de alta calidad. *Cultivos Tropicales*. 26 (3): 39-43.

Muszyñski S y Gladyszewsk B, 2008. Representation of He-Ne laser irradiation effect on radish seeds with selected germination indices. *Int. Agrophysics.* 22, 151-157.

Podlesny J, Misiak L y Koper R, 2001. Concentration of free radicals in faba bean seeds alter the presowing treatment of the seeds with laser light. *Int. Agrophysics*. 15(3): 185-189.

Ramírez R, González LM, Licea L, García B, Porras E y Pérez A, 2000. Incidencia de bajas dosis de rayos x sobre la productividad de cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Alimentaria.* 314: 56-64.

Ramírez R, 2006. Efecto del tratamiento de semillas con dosis estimulantes de rayos X en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tesis presentada en opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana, Cuba, 130 pp.

Ramírez R, González LM, Camejo Y, Fernández Y y Zaldívar N, 2006. Estudio de radiosensibilidad en plantas de tomate procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de rayos X. *Cultivos Tropicales*. 27(1): 63-67.

Stell RGD y Torrie JH, 1992. Biostatistics. Principles and procedures". 2nd ed., McGrawHill, Interamericana de Mexico, S.A.

Vasilevski IG y Bosev D, 2009. Results of the effect of the laser light on some vegetables. *Journal of International Society for Horticultural Science*. 15(3): 21-28.

Wilczek M y Fordoński G, 2007. Influence of presowing laser stimulation of seeds on photosynthesis and transpiration intensity and on yielding of red clover. *Acta Agrophysica*. 9(2): 517-524.

Yandell J, 1997. Practical Data Analysis for Designed Experiments. Chapman & Hall Press.

(Aceptado para publicación el 14 de julio de 2011)

Implicación comercial e industrial de la variabilidad del contenido en aceite y proteína y de los caracteres físicos del fruto y de la pepita del almendro en las condiciones climáticas mediterráneas

O. Kodad[*,**], A. Mamouni[***], M. Lahlo[***] y R. Socias i Company[*1]

[1] Autor para correspondencia. E-mail: rsocias@aragon.es
* Unidad de Fruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España
** Departamento de Fruticultura, Escuela Nacional de Agricultura, Meknès, Marruecos
*** Unité de Recherche, Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phytogénétiques, INRA, Meknès, Marruecos

Resumen

Se determinaron los caracteres físicos y la composición química de los frutos de 11 cultivares de almendro cultivados en dos zonas distintas, Zaragoza (España) y Meknès (Marruecos). Independientemente de la variabilidad entre cultivares para todos los parámetros medidos, el efecto del año fue significativo para todos los parámetros físicos, excepto para el espesor de la pepita. Igualmente fue significativo el efecto de la localidad para todos los parámetros físicos, excepto para la longitud y el índice de esfericidad del fruto, la longitud y la anchura de la pepita, y el rendimiento en pepita. La calidad física de las pepitas producidas en Zaragoza fue mayor que las producidas en Meknès, probablemente por el diferente sistema de cultivo y las condiciones ambientales que fueron más extremas en Meknès. Estos resultados muestran que las condiciones de cultivo adecuadas favorecen el aumento de los caracteres conducentes a una mayor calidad física del fruto y de la pepita. En cuanto al contenido en aceite y en proteína, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos y las localidades. Las condiciones ambientales y de cultivo de Zaragoza favorecieron la acumulación de aceite en la pepita, mientras que las de Meknès favorecieron la acumulación de proteína. Ello apunta a que la utilización industrial de los distintos cultivares estudiados no sólo depende del propio cultivar, sino también de las condiciones ambientales y de cultivo, lo que debe tenerse muy en cuenta para la valorización de la producción en las distintas zonas de cultivo del almendro.

Palabras clave: Almendro, fruto, parámetros físicos, composición, calidad, variabilidad, clima.

Summary

Commercial and industrial implication of the variability of oil and protein content and of the nut and kernel physical traits of almond in Mediterranean climates

The fruit physical traits and the chemical composition were determined for 11 almond cultivars grown in two different regions: Zaragoza (Spain) and Meknès (Morocco). Independently of the variability among cultivars for all traits measured, the year effect was significant for all physical traits except for kernel thickness. The location effect was significant for all physical traits except for fruit length and sphericity, kernel length and width, and kernel percentage. The physical quality of the kernels produced in Zaragoza was higher that that of the kernels produced in Meknès, probably because of the different growing system and the environmental conditions, more extreme in Meknès. These results show that adequate growing conditions favour the increase of traits leading to increased physical quality of nuts and kernels. The

cultivar and the location effects were significant for the contents of oil and protein. The environmental and growing conditions of Zaragoza led to a higher oil accumulation, whereas those of Meknès to a higher protein accumulation. These results indicate that the industrial utilization of the different almond cultivars does not only depend on the cultivar, but also on the environmental and growing conditions, a fact to be considered when marketing the production of the different growing regions.

Key words: Almond, fruit, physical parameters, composition, quality, variability, climate.

Introducción

En el almendro (*Prunus amygdalus* Batsch), las características del fruto y de la pepita siguen siendo criterios determinantes en el momento de la elección de un cultivar para su plantación e igualmente discriminantes en un programa de mejora genética. Los cultivares de almendro pueden caracterizarse y evaluarse por su calidad comercial, industrial, sensorial y nutricional. La calidad comercial se refiere a todos los caracteres relacionados con el aspecto general del fruto, incluyendo tamaño, forma, textura, peso y color de la pepita, así como la ausencia de pepitas dobles. La calidad industrial se refiere a la compatibilidad del fruto de un cultivar determinado con los distintos manejos post-cosecha y a su aptitud para la fabricación de diferentes productos (Socias i Company *et al*., 2008).

La dureza de la cáscara es uno de los caracteres más importantes del fruto, por su papel en la protección de la pepita y por el tipo de maquinaria utilizada en el descascarado. Este carácter parece estar bajo control poligénico (Kester *et al*. 1977), aunque con una gran influencia ambiental (Kodad *et al*., 2010b). El tamaño de la pepita es igualmente importante, ya que las pepitas de gran tamaño tienen más valor comercial (Socias i Company *et al*., 2008). Este carácter, altamente correlacionado con el peso de la pepita, es variable de un año a otro (Godini, 2002; Grasselly, 1972). La forma de la pepita es una característica varietal (Gülcan, 1985) y está correlacionada con la forma del fruto. La forma se define por sus dimensiones, longitud, anchura y espesor, se transmite a la descendencia (Grasselly, 1972) y parece estar bajo controlo poligénico (Arteaga y Socias i Company, 2002; Kester *et al*., 1977). La longitud y en un grado menor la anchura de la pepita vienen predeterminados por el tamaño de la cavidad del fruto durante las primeras fases de su desarrollo, mientras que el espesor depende de la acumulación de nutrientes durante la fase final del desarrollo del fruto, fase muy vulnerable frente a distintos estreses ambientales (sequía, altas temperaturas, etc…) que puedan tener lugar durante este período del crecimiento del fruto (Kester y Gradziel, 1996). Las dimensiones de la pepita definen algunos de sus usos comerciales, ya que las pepitas alargadas suelen elegirse para la producción de filetes uniformes de almendra (Schirra, 1997), mientras que las pepitas redondas y de tamaño medio son más adecuadas para la fabricación de peladillas y de bombones de chocolate.

La composición química de la pepita es un aspecto de gran interés en la determinación de la calidad nutricional y el uso industrial que se le puede dar a un cultivar, teniendo en cuenta que el uso final de la pepita depende de los valores medios de cada componente químico, como el aceite, la proteína y los azúcares (Berger, 1969). Los contenidos en aceite y en proteína son muy importantes para la industria de la repostería, ya que un alto contenido en aceite implica una absorción baja del agua por la pasta de la almendra (Alessandroni, 1980), manteniendo así la ca-

lidad de la misma. Un contenido bajo en aceite de la pepita se prefiere para la producción de harina y de leche de almendra y para otros productos debido a su alto contenido en proteína (Longhi, 1952). Tanto el contenido en aceite como en proteína son caracteres que dependen del genotipo y de las condiciones ambientales (Abdallah *et al*., 1998; Kodad, 2006; Kodad *et al*., 2010a).

El notable efecto de las condiciones climáticas y ambientales durante el desarrollo del fruto sobre los caracteres físicos del fruto y de la pepita y sobre su composición puede afectar la calidad nutricional, comercial e industrial de un cultivar determinado. La evaluación de la estabilidad de estos caracteres durante varios años y en ambientes distintos permitiría aconsejar los cultivares más estables a los agricultores, sobre todo en zonas áridas, con una gran variabilidad en su estado hídrico. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de los caracteres físicos del fruto y de los contenidos en aceite y en proteína para un grupo de cultivares de origen diverso cultivados en dos condiciones mediterráneas distintas con el fin de determinar la estabilidad de la calidad de estos cultivares y su posterior implicación comercial y industrial.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se estudiaron los frutos de 11 cultivares, cuyas características pomológicas de encuentran detalladas en Felipe (2000). La producción analizada procede de dos zonas de cultivo diferentes, el banco de Germoplasma del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón en Zaragoza (CITA) y la estación experimental del Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA) en la región de Meknès, situada en el centro de Maruecos. La parcela experimental del CITA está situada a unas coordenadas de 41°38′ N y 0°53′ W, a 220 m sobre el nivel del mar, en un suelo de tipo aluvial, con textura franca en superficie a franco-limosa en profundidad. En esta colección las árboles reciben riego y están plantados a un marco de de 3 × 5 m. La parcela experimental del INRA está situada a una coordinadas de 33°55′ N y 5°13′ W, a 500 m sobre el nivel del mar, con el mismo marco de plantación de 5 × 3 m, pero sin aporte de agua, en un suelo profundo de tipo pluvial y de textura franca. En ambas estaciones la poda se practica anualmente y es de tipo largo. Los árboles están formados en vaso abierto, con tres árboles por cultivar.

Caracteres físicos de la pepita

El presente estudio se llevó a cabo durante dos años consecutivos, 2008 y 2009. Para determinar las características físicas del fruto se cogieron 25 frutos maduros al azar de los tres árboles de cada cultivar. Se determinó el peso del fruto y de la pepita usando una balanza electrónica de precisión. Se midieron las dimensiones del fruto y de la pepita (longitud: L, anchura: A; espesor: E) mediante un pie de rey digital con una precisión de 0,01 mm. A partir de estas variables se calculó el diámetro geométrico (*Dg*) y el índice de esfericidad (*Ø*) del fruto y de la pepita utilizando las siguientes ecuaciones (Aydin, 2003): $Dg = (LAE)^{1/3}$ y $Ø = Dg/L$ (Tabla 1).

Análisis químicos de la pepita

Los análisis químicos se llevaron a cabo en 2009. Se extrajo el aceite de las pepitas, anteriormente repeladas y molidas, con éter de petróleo como solvente utilizando el aparato de extracción Soxtec Avanti 2055 (Selecta, Barcelona, España), durante 2 horas a una temperatura de 135ºC (Kodad y Socias i Company, 2008). El contenido total de aceite se determinó por duplicado. Los resultados se expre-

Tabla 1. Características estudiadas en el fruto y la pepita de los cultivares de almendro y su abreviatura
Table 1. Traits studied in the fruit and the kernel of the almond cultivars and their abbreviation

Carácter	Abreviatura
Peso del fruto (g)	**Pf**
Longitud del fruto (mm)	*Lf*
Anchura del fruto (mm)	*LrF*
Espesor del fruto (mm)	*EPF*
Diámetro geométrico del fruto	*Dgf*
Índice de esfericidad del fruto	*Øf*
Peso de la cáscara (g)	*PQ*
Peso de la pepita (g)	*Pn*
Longitud de la pepita (mm)	*LP*
Anchura de la pepita (mm)	*LrP*
Espesor de la pepita (mm)	*ESP*
Diámetro geométrico de la pepita	*Dgp*
Índice de esfericidad de la pepita	*Øp*
Rendimiento en cáscara (%)	*Rdtc*

saron en porcentaje del peso de aceite en relación al de la muestra total. El contenido en proteína total se determinó por el método Dumas, que consiste en la determinación de la tasa del nitrógeno total. Multiplicando esta tasa por un factor específico del almendro (6.25) se obtuvo el porcentaje de proteína total. Los análisis se realizaron por duplicado y los resultados se expresan como el porcentaje de proteína sobre el peso total (Kodad, 2006).

Resultados

Variación de los caracteres físicos del fruto y de la pepita

Como era de esperar existen diferencias significativas entre los cultivares estudiados en cuanto a todos los caracteres físicos del fruto (Tabla 2) y de la pepita (Tabla 3). Los rangos de variación fueron para el peso del fruto de 2,2 g en 'Vivot' a 5,7 g en 'Ferraduel'; el peso de la cáscara de 1,1 g en 'Retsou' a 4,38 g en 'Ferraduel'; la longitud del fruto de 22,3 mm en 'Colorada' a 26,2 mm en 'Fournat de Brézenaud'; el espesor del fruto de 12,7 mm en 'Retsou' a 18,2 en 'Desmayo Rojo' (Tabla 4). Para la pepita fueron: el peso de 1,03 g en 'Vivot' a 1,6 g en 'Fournat de Brézenaud'; la longitud de 21,7 mm en 'Vivot' a 28,7 mm en 'Fournat de Brézenaud'; el espesor de 3,1 mm en 'Ferraduel' a 8,5 mm en 'Desmayo Rojo' (Tabla 5).

El efecto del año climático, considerando ambas localidades, resultó significativo para todos los caracteres considerados, con la excepción de la anchura de la pepita (Tablas 2 y 3). En cuanto al peso del fruto, el valor medio registrado en al año 2008 (4,11 g) fue inferior que en al año 2009 (4,39 g). Sin embargo, algunos cultivares ('Del Cid', 'Vivot, 'Ferraduel', 'Fournat de Brézenaud', 'Picantilli', y 'Retsou') mostraron valores estables del peso del fruto entre ambos años del estudio y en ambas estaciones experimentales (Tablas 4 y 5). Para el peso de la cáscara, los valores medios del año 2008 (2,89 g) fueron más bajos que los del 2009 (3,12 g) en ambas estaciones (Tabla 6). Los cultivares que mostraron valores similares entre ambos años y en ambas estaciones son: 'Del Cid', 'Vivot', 'Fournat de Brézenaud' y 'Retsou' (Tabla 4). En cuanto a las dimensiones del fruto, los valores determinados en 2008 fueron más bajos que en 2009 (Tabla 6). La longitud y el espesor del fruto fueron los caracteres más variables entre ambos años. 'Del Cid', 'Fournat de Brézenaud', 'Picantilli', 'Retsou' y 'Vivot' mostraron valores similares del índice de esfericidad del fruto y de la pepita (Tabla 4). Sin embargo, los demás cultivares mostraron diferencias significativas, pero no drásticas, entre ambos años en cuanto a estos caracteres determinantes de la forma del fruto. Los análisis

Tabla 2. Análisis de varianza de los caracteres físicos del fruto de los cultivares estudiados
Table 2. Analysis of variance of the fruit physical traits of the cultivars studied

Fuente de variación	gl	PF[z]	PQ	Lf	LrF	EPF	Dgf	Øf
Cultivar (Cul)	10	63,9***	60,9***	480,3***	388,8***	121,9***	203,9***	0,13***
Año	1	122,5***	78,8***	492,6***	504,5***	190,1***	376,5***	0,01***
Cultivar × Año	10	13,4***	9,1***	98,2***	32,8***	27,1***	32,8***	0,007**
Estación (Est)	1	11,6***	7,4***	33,4**	0,5ns	24,5***	14,6**	0,004ns
Cul × Est	10	2,6***	1,2***	28,4***	17,6***	2,8*	8,1***	0,002**
Año × Est	1	3,5**	2,09*	42,8**	8,7ns	2,4ns	10,5**	0,0003ns
Cul × Año × Est	10	2,9***	1,9***	25,6***	26,5***	8,7***	12,5***	0,005***
Error	529	0,38	0,37	4,7	3,58	1,46	1,43	1,92

ns, *,**, ***: No significativo o significativo a P = 0,05, 0,01 o 0,001, respectivamente.

[z] Abreviaturas correspondientes en la Tabla 1.

Tabla 3. Análisis de varianza de los caracteres físicos de la pepita de los cultivares estudiados
Table 3. Analysis of variance of the kernel physical traits of the cultivars studied

Fuente de variación	G.L	Pn[z]	LP	LrP	EPN	Dgp	ØP	Rdtc
Cultivar (Cul)	10	1,2***	236,1***	105,9***	11,9***	15,7***	0,08***	5896,1***
Año	1	4,9***	192,1***	114,4***	0,4ns	33,1***	0,007**	1462,7***
Cultivar × Año	10	0,49***	76,9***	12,8***	3,3***	7,9***	0,01***	436,8***
Estación (Est)	1	0,32**	6,4ns	0,0025ns	14,3***	2,9*	0,01***	0,02ns
Cul × Est	10	0,23**	22,3***	2,5**	1,9***	3,1***	0,003**	75,7ns
Año × Est	1	0,18*	15,2*	3,09*	6,8***	7,02***	0,001ns	66,5ns
Cul × Año × Est	10	0,14**	11,9***	5,9***	2,3***	2,9***	0,005***	104,5*
Error	529	0,02	2,43	0,73	0,35	0,44	0,0004	46,8

ns, *,**, ***: No significativo o significativo a P = 0,05, 0,01 o 0,001, respectivamente.

[z] Abreviaturas correspondientes en la Tabla 1.

estadísticos mostraron diferencias significativas entre los años para la dureza de la cáscara (Tabla 3), que es uno de los caracteres importantes para la industria, ya que de ella depende la presión a aplicar para descascarar el fruto.

El peso de la pepita mostró diferencias significativas entre los años del estudio (Tabla 3). Sin embargo, 'Colorada', 'Desmayo Rojo', 'Del Cid', 'Retsou' y 'Vivot' mostraron valores estables entre ambos años y en ambas estaciones (Tabla 5). Las dimensiones de la pepita mostraron a su vez diferencias significativas entre los años y en ambas localidades (Tabla 3). No obstante, la magnitud de esta variación no es elevada considerando la posibilidad de perjudicar la calidad de las almendras.

En cuanto al efecto de la zona de cultivo, los análisis revelaron diferencias significativas

Tabla 4. Caracteres físicos del fruto de los cultivares estudiados en cada año y localidad
Table 4. Fruit physical traits in the studied cultivars for each year and location

Cultivar	Localidad	Pf		PQ		Lf		LrF		EPF		Dgf		Øf	
		2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Atocha	España	4,90	5,58	3,70	4,12	35,13	36,99	23,77	23,84	16,38	16,64	23,83	24,41	0,68	0.66
	Marruecos	4,37	4,87	3,39	3,68	33,70	35,77	24,52	22,14	15,99	16,97	23,63	23,76	0,70	0.66
Castilla	España	5,14	6,14	3,95	4,73	31,07	32,73	24,49	26,18	15,67	16,61	22,80	24,18	0,74	0.74
	Marruecos	5,00	4,06	3,82	3,09	30,90	29,55	24,39	21,65	16,89	15,74	23,35	21,60	0,76	0.73
Colorada	Marruecos	3,52	4,13	2,34	3,06	29,95	30,93	21,64	20,61	14,87	15,67	21,25	21,51	0,71	0.70
	España	3,97	4,40	2,71	3,22	31,62	30,90	22,96	24,01	14,21	15,37	21,76	22,50	0,69	0.73
D. Largueta	España	4,66	5,70	3,44	4,16	35,91	41,81	23,89	26,93	14,68	14,83	23,25	25,55	0,65	0.61
	Marruecos	3,21	4,27	2,24	3,11	33,07	34,66	20,15	22,25	12,55	14,31	20,29	22,25	0,61	0.64
D. Rojo	Marruecos	4,56	5,65	3,43	4,40	30,27	32,52	22,86	27,22	17,16	17,57	22,75	24,95	0,75	0.77
	España	5,77	6,18	4,45	4,89	33,84	33,04	28,27	27,14	19,13	19,07	26,34	25,75	0,78	0.78
DelCid	España	6,15	5,67	4,78	4,17	36,69	34,61	25,18	23,23	18,18	17,70	25,61	24,21	0,70	0.70
	Marruecos	2,25	2,31	1,35	1,40	27,12	26,64	19,60	19,07	13,94	13,86	19,49	19,13	0,72	0.72
Vivot	España	3,61	3,64	2,69	2,58	30,63	32,48	20,56	19,84	14,76	14,46	21,02	21,04	0,69	0.65
	Marruecos	3,32	3,34	2,28	2,28	30,83	30,07	19,74	19,97	14,15	15,21	20,48	20,64	0,66	0.69
Ferraduel	España	5,12	6,87	3,91	5,26	36,58	40,06	25,51	26,94	16,25	18,22	24,74	26,97	0,68	0.68
	Marruecos	5,58	5,25	4,37	4,00	38,52	36,80	24,89	24,91	16,66	16,34	25,18	24,64	0,66	0.67
Fournat de B.	España	4,64	4,53	2,85	2,96	39,16	39,48	27,35	25,35	17,77	16,83	26,68	25,62	0,63	0.65
	Marruecos	4,35	4,36	2,87	2,82	38,93	39,72	25,61	26,32	15,87	16,61	25,09	25,89	0,64	0.65
Picantilli	España	2,86	3,18	1,51	1,81	35,10	35,69	23,98	25,22	15,33	17,35	23,41	24,98	0,67	0.70
	Marruecos	2,70	2,11	1,23	0,83	36,84	34,05	23,76	22,35	13,18	12,88	22,58	21,39	0,61	0.63
Retsou	España	2,30	2,39	1,17	1,24	32,93	31,87	17,03	17,56	12,81	13,98	19,27	19,83	0,58	0.62
	Marruecos	2,10	2,02	1,06	0,95	33,83	32,54	17,76	16,40	12,56	11,78	19,58	18,45	0,58	0.57
Media		**4.09**	**4,39**	**2,89**	**3,13**	**33,76**	**34,22**	**23,09**	**23,14**	**15,41**	**15,82**	**22,84**	**23,15**	**0,68**	**0,68**

Tabla 5: Caracteres físicos de la pepita de los cultivares estudiados en cada año y localidad
Table 5. Kernel physical traits in the studied cultivars for each year and location

Cultivar	Localidad	Pn		LP		LrP		ESP		DgP		ØP		Rdtc	
		2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Atocha	España	1,2	1,46	26,01	28,75	13,76	14,59	7,23	7,82	13,71	14,66	0,53	0,51	25,12	26.67
	Marruecos	0,97	1,19	22,92	25,87	13,64	13,75	7,00	6,96	12,97	13,39	0,57	0,52	22,74	24.63
Castilla	España	1,19	1,41	22,92	23,05	13,99	15,45	8,22	8,72	13,80	14,48	0,60	0,63	23,55	23.16
	Marruecos	1,18	0,97	22,20	21,67	14,15	14,08	8,92	7,70	12,20	12,73	0,64	0,59	23,73	24.38
Colorada	España	1,19	1,06	22,88	22,97	13,07	13,95	8,48	7,14	13,81	12,81	0,60	0,56	33,61	26.31
	Marruecos	1,26	1,18	24,90	23,50	14,09	14,59	7,87	7,23	13,24	13,62	0,57	0,58	32,18	27.76
D. Largueta	España	1,22	1,54	25,79	28,87	13,15	14,97	7,07	7,27	14,08	14,46	0,55	0,50	30,90	28.00
	Marruecos	0,92	1,16	24,98	25,00	11,50	12,98	7,97	7,75	12,84	12,59	0,51	0,54	26,64	27.48
D. Rojo	España	1,32	1,30	23,12	22,22	15,15	14,92	9,01	8,52	14,65	14,12	0,63	0,64	23,06	21.36
	Marruecos	1,18	1,25	21,72	23,41	13,08	15,19	8,73	7,73	13,66	13,91	0,63	0,60	24,79	22.72
DelCid	España	1,66	1,50	28,58	26,96	15,15	14,93	7,86	7,58	15,31	14,49	0,54	0,54	25,85	26.84
	Marruecos	0,90	0,91	20,83	20,73	12,08	12,92	8,56	7,76	12,91	12,54	0,62	0,61	40,11	39.70
Ferraduel	España	1,21	1,61	24,27	27,11	15,05	16,55	6,51	7,03	13,50	14,65	0,56	0,54	23,73	24.02
	Marruecos	1,21	1,25	25,49	25,06	15,08	15,74	7,81	6,99	13,51	13,83	0,57	0,55	21,90	24.41
Fournat de B.	España	1,78	1,57	28,75	29,18	17,02	16,13	7,84	6,84	15,62	14,76	0,54	0,51	38,49	35.09
	Marruecos	1,49	1,54	28,67	28,31	16,15	16,45	7,25	6,92	15,12	14,76	0,53	0,52	34,74	36.35
Picantilli	España	1,35	1,37	25,36	24,28	15,05	15,73	7,27	7,38	14,03	14,09	0,55	0,58	48,22	43.34
	Marruecos	1,47	1,28	28,85	26,25	14,03	14,51	7,44	6,80	13,76	13,70	0,51	0,52	55,76	65.97
Retsou	España	1,14	1,15	27,05	27,07	11,22	11,36	7,73	7,90	13,28	13,43	0,49	0,50	50,81	49.06
	Marruecos	1,04	1,07	28,04	26,44	11,25	11,32	7,87	7,92	12,53	13,32	0,48	0,51	50,42	54.08
Vivot	España	0,96	1,07	21,21	22,97	12,73	13,61	6,88	7,00	12,28	12,65	0,58	0,55	25,50	30.12
	Marruecos	1,04	1,05	22,32	21,92	12,08	13,62	8,24	7,83	12,34	13,07	0,60	0,60	32,05	32.07
Media		1,22	1,27	24,86	25,07	13,75	14,42	7,81	7,49	13,6	13,73	0,56	0,55	32,45	32,43

Tabla 6. Valores medios de los caracteres físicos estudiados en cada localidad y en cada año del estudio
Table 6. Mean values for the physical traits studied in each location and year

Variable	año	España	Marruecos	Variable	año	España	Marruecos
Caracteres del fruto				Caracteres de la pepita			
PF [z]	2008	4,46a	3,72b	*Pn*	2008	1,29a	1,15b
	2009	4,94a	3,85b		2009	1,37a	1,17b
PQ	2008	3,20a	2,58b	*LN*	2008	25,08a	24,63a
	2009	3,56a	2,69b		2009	25,77a	24,38b
Lf	2008	34,42a	33,09a	*LrP*	2008	14,12a	13,38b
	2009	35,42a	33,02b		2009	14,75a	14,1a
LrF	2008	23,91a	22,27a	*EPN*	2008	7,64a	7,97a
	2009	24,21a	22,08b		2009	7,56a	7,42a
EPF	2008	15,92a	14,89b	*Dgp*	2008	14,01a	13,19b
	2009	16,46a	15,18b		2009	14,05a	13,41a
DgF	2008	23,52a	22,15a	*Øp*	2008	0,56a	0,57a
	2009	24,09a	22,2b		2009	0,55a	0,56a
Øf	2008	0,68a	0,67a	*Rdtc*	2008	31,71a	33,19a
	2009	0,68a	0,68a		2009	30,36a	34,5b

Valores con letras distintas son significativamente diferentes entre las localidades por el test LSD a P = 0,05.
[z] Abreviaturas correspondientes en la Tabla 1.

para todos los caracteres considerados, con la excepción de la longitud y la anchura de la pepita, la anchura y el índice de esfericidad del fruto y el rendimiento en pepita (Tablas 2 y 3). Los valores medios fueron más altos en las muestras procedentes del CITA de Aragón (Tablas 4 y 5). El rendimiento en pepita fue mayor en las muestras del INRA de Meknès (Tabla 5), indicando que la cáscara es más blanda en las condiciones de Meknès que en las de Zaragoza. La magnitud de las diferencias entre ambas estaciones experimentales, en ambos años, fueron muy marcadas en el caso de 'Del Cid' y 'Picantilli'. 'Castilla', 'Colorada', 'Desmayo Largueta' y 'Ferraduel' mostraron valores similares entre ambas localidades y los dos años del estudio.

El peso de la pepita (Tabla 6) fue más elevado en las muestras de Zaragoza (1,33 g) que en las de Meknès (1,15g). El efecto significativo de la interacción Cultivar × Zona de cultivo en estos caracteres, indica que el comportamiento de cada cultivar depende de las condiciones ambientales de la zona de cultivo (Tabla 3). 'Colorada' y 'Desmayo Largueta' mostraron valores ligeramente elevados para las muestras de Meknès (Tabla 4). La magnitud de las diferencias fue mayor entre las dos localidades, incluyendo ambos años, para 'Atocha', 'Desmayo Largueta' y 'Del Cid'. Sin embargo, 'Castilla' y 'Ferraduel' mostraron diferencias elevadas entre ambas localidades sólo en 2009.

En cuanto a la longitud y la anchura de la pepita, los valores fueron similares entre ambas localidades (Tabla 6), aunque 'Atocha' y 'Del Cid' sí mostraron diferencias significativas entre localidades, siendo mayores los valores

registrados en las condiciones de Zaragoza (Tabla 5). Aunque el espesor de la pepita mostró diferencias significativas entre ambas localidades (Tabla 3), la magnitud de estas diferencias no fue muy elevada (Tabla 6). Para el índice de esfericidad y el diámetro geométrico de la pepita, las diferencias entre las dos localidades no fueron muy elevadas (Tabla 6), aunque sí estadísticamente significativas (Tabla 3). Los valores del espesor de la pepita fueron más elevados en las muestras de Zaragoza, siendo 'Del Cid' y 'Picantilli' las que mostraron los valores más dispares entre las localidades y en ambos años del estudio (Tabla 5).

Variación de los contenidos en aceite y proteína

Los valores del contenido en aceite variaron considerablemente entre los cultivares, con el valor más elevado (60,9%) en 'Vivot' y el menor (52%) en 'Picantillii'. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en los contenidos en aceite, en proteína y en la relación aceite/proteína entre los genotipos y entre las localidades, así como en la interacción genotipo × localidad (Tabla 7). El menor contenido en proteína fue en 'Vivot' (17,3%) y el mayor en 'Retsou' (31%). Sin embargo, al analizar los rangos de variabilidad en cada localidad se observó que en Zaragoza los valores del contenido en aceite variaron entre 52% en 'Desmayo Largueta' y 63,8% en 'Vivot' y en proteína entre 14% en 'Vivot' y 29% en 'Retsou'. En Meknès, los valores del contenido en aceite variaron entre 46% en 'Desmayo Rojo' y 61% en 'Del Cid' y en proteína entre 20% en 'Vivot' y 32% en 'Retsou' (Tala 8). Los valores del contenido en aceite fueron más elevados en las muestras procedentes de Zaragoza (Tabla 8), mientras que los valores del contenido en proteína fueron más elevados en las muestras procedentes de Meknès. Sin embargo, 'Desmayo Largueta' y 'Del Cid' mostraron valores más elevados de proteína y más bajos de aceite en las muestras de Zaragoza (Tabla 8). 'Atocha' y 'Picantilli' mostraron valores similares del contenido en aceite en ambas localidades (Tabla 8). En cuanto a la relación aceite/proteína, 'Desmayo Largueta', 'Del Cid' y 'Fournat de Brézenaud' no mostraron diferencias significativas entre ambas localidades (Tabla 8). En las dos localidades se ha observado una correlación negativa entre el contenido en aceite y en proteína, como ya se ha descrito (Askin *et al*., 2007; Font i Forcada *et al*., 2011; Kodad *et al*., 2004), pero la magnitud de esta correlación fenotípica fue muy distinta entre las dos estaciones (r = -0,59 en Zaragoza y r = -0,78 en Meknès).

Tabla 7. Análisis de varianza de los de los contenidos en aceite y en proteína de los cultivares estudiados
Table 7. Analysis of variance of the oil and protein content of the cultivars studied

Fuente de variación	gl	Contenido en aceite	Contenido en proteína	Aceite / Proteína
Cultivar	10	32,7***	65,11***	1,11***
Estación	1	152,3***	202,61***	3,88***
Cultivar × Estación	10	33,7***	16,28***	0,45***
error	22	2,67	0,74	0,01

ns, *,**, ***: No significativo o significativo a P = 0,05, 0,01 o 0,001, respectivamente.

Tabla 8. Valores medio de los contenidos en aceite y en proteína de los cultivares estudiados en cada localidad
Table 8. Mean values of the oil and protein content in the cultivars studied for each location and year

Cultivar	Localidad	Contenido en aceite (%MS)	Contenido en proteína (%)	Aceite / Proteína (R)
Atocha	España	53,14a	25,15a	2,11a
	Marruecos	53,46a	29,33b	1,82b
	Media	53,3	27,24	1,96
Castilla	España	57,26a	23,91b	2,39a
	Marruecos	50,74b	30,48a	1,66b
	Media	54	27,19	1,99
Colorada	España	62,12a	17,59b	3,53a
	Marruecos	54,14b	23,13a	2,34b
	Media	58,13	20,36	2,86
Desmayo Largueta	España	52,63a	25,93a	2,03b
	Marruecos	55,78a	23,84b	2,34a
	Media	54,2	24,88	2,18
Desmayo Rojo	España	60a	19,44b	3,09a
	Marruecos	46,39b	30,79a	1,51b
	Media	53,19	25,15	2,12
Del Cid	España	54,39b	24,41a	2,23
	Marruecos	61,29a	21,26a	2,88
	Media	57,84	22,83	2,53
Ferraduel	España	58,35a	18,73b	3,12a
	Marruecos	55,37b	23,85a	2,32b
	Media	56,86	21,29	2,67
Fournat de Brézenaud	España	62,13a	20,86b	2,98a
	Marruecos	57,33b	25,21a	2,27a
	Media	59,73	23,03	2,59
Picantilli	España	53,18a	25,04b	2,12a
	Marruecos	52,26a	29,45a	1,77a
	Media	52,72	27,24	1,94
Retsou	España	61,76a	29,20a	2,12a
	Marruecos	53,19b	32,82a	1,62b
	Media	57,475	31,01	1,85
Vivot	España	63,89a	14,46b	4,42a
	Marruecos	58,8b	20,01a	2,94b
	Media	61,34	17,23	3,56

Valores con letras distintas son significativamente diferentes entre las dos localidades por el test LSD a P = 0,05.

Discusión

Caracteres físicos del fruto

La variabilidad de los caracteres físicos del fruto de los cultivares estudiados ya ha sido mencionada anteriormente (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1980; Gülcan, 1985; Socias i Company *et al*., 2008). La variación interanual de los caracteres físicos del fruto y de la pepita ha sido bien estudiada, mostrando claramente el efecto del año climático sobre estos caracteres (Grasselly y Crossa-Raymand, 1980; Egea *et al*., 2009; Felipe, 2000; Kodad, 2006; Nieddu *et al*., 1989; Saura Calixto *et al*., 1988), aunque la forma del fruto y la relación pepita/cáscara son independientes del tamaño. Sin embargo, en nuestro estudio estas diferencias no han sido drásticas y no afectarían a la calidad comercial de la pepita, aunque resalta la importancia de adecuar los cuidados culturales (riego, abonado, tratamientos fitosanitarios) a las condiciones climáticas del año para favorecer su efecto beneficioso sobre la calidad. A tal efecto, debe recordarse que la plantación del CITA de Aragón se riega mientras que la del INRA de Meknès no.

Los valores medios de los caracteres físicos del fruto y de la pepita han sido mayores en las muestras procedentes del CITA de Aragón. La dureza de la cáscara no mostró diferencias significativas entre ambas estaciones y en ambos años, dando por resultado que el rendimiento en pepita fue más elevado en las muestras de Meknès que en las de Zaragoza. Este carácter viene determinado por el peso de la cáscara (Felipe, 2000), que a su vez fue más alto en las muestras de Zaragoza. Algunos cultivares ('Castilla', 'Colorada', 'Desmayo Largueta' y 'Ferraduel') mostraron valores similares entre ambas estaciones y en los dos años. Estos cultivares poseen cáscara dura o muy dura, lo que probablemente explica la estabilidad de su dureza. Kodad (2006) señaló que los cultivares de cáscara dura no muestran una variabilidad interanual significativa, mientras que las de cáscara blanda se ablandaron más en años de sequía. La pérdida de peso y de dureza de la cáscara podría ser debida a la débil lignificación y endurecimiento de la misma a causa de la sequía. Estos resultados indican claramente que los cultivares de cáscara dura o muy dura son los más adecuados para zonas áridas del mediterráneo y para el cultivo en secano, ya que no pierden su dureza. Ello implica menos ataques bióticos y mejor protección de la pepita en el árbol y durante el almacenaje y menores pérdidas en el descascarado, ya que en la cuenca mediterránea la maquinaria está diseñada para cáscara dura. Optar por cultivares de cáscara semi-dura o blanda implicaría una gran variación interanual en zonas de cultivo áridas, así como la pérdida de calidad que conlleva y el aumento de pérdidas en el descascarado.

Existen referencias contradictorias sobre el efecto del riego en los caracteres físicos de la pepita como el peso o el tamaño, desde que no les afecta (Nanos *et al*., 2002), a que los aumenta (Neiddu *et al*., 1989), o a que en condiciones de sequía el peso de la pepita es mayor (Valverde *et al*., 2006). Estas diferencias podrían deberse a los distintos cultivares estudiados y a su grado de tolerancia a la sequía, a la intensidad de la sequía y de las condiciones climáticas (humedad y temperatura), así como al nivel de producción. En cualquier caso, parece ser que cuanto más severa es la sequía en condiciones de secano, mayores son los efectos de la falta de agua sobre los caracteres físicos del fruto y de la pepita (Egea *et al*., 2009; Goldhamer *et al*., 2006).

Las diferencias del peso de la pepita entre las dos localidades no fueron significativas para algunos cultivares, pero sí en otros, como 'Atocha', Desmayo Largueta' y 'Del Cid'. Ello puede indicar diferencias en cuanto a la tolerancia a la sequía entre cultivares. La disminución del peso de la pepita, y por consi-

guiente de su tamaño, perjudica el valor comercial de la misma, ya que las pepitas de gran tamaño tienen mayor valor comercial (Socias i Company *et al*., 2008). El tamaño de la pepita está determinado por sus dimensiones, especialmente la longitud y la anchura, que se establecen durante la primera fase del desarrollo del fruto en la primavera, cuando tiene lugar la multiplicación celular (Egea *et al*., 2009; Hawker y Buttrose, 1980), completándose en abril o mayo, según la zona de cultivo. Cualquier anomalía fisiológica durante este período podría modificar tanto el peso como el tamaño final de la pepita (Egea *et al*., 2009; Hill *et al*., 1987). Sin embargo, la longitud y la anchura de la pepita no mostraron diferencias significativas entre ambas localidades, lo que probablemente indica que la humedad del suelo en ambas estaciones no fue deficiente durante este período, debido a las altas precipitaciones registradas durante el invierno y el principio de la primavera (datos no mostrados).

Los valores del espesor de la pepita, por otra parte, fueron superiores en las muestras procedentes del CITA de Aragón, siendo 'Del Cid' y 'Picantilli' los cultivares que mostraron valores más dispares entre las dos estaciones para los dos años. Un estrés hídrico acentuado antes de la maduración de la pepita se refleja en la disminución de su espesor debido probablemente a la falta de acumulación de agua y nutrientes (Egea *et al*. 2009; Goldhamer y Viveros, 2000; Goldhamer *et al*., 2006). En Meknès las precipitaciones fueron nulas durante los meses de julio y agosto de los dos años, con temperaturas elevadas (datos no mostrados), lo que aumentó el estrés hídrico durante esta fase del año a estos cultivares cultivados en secano. Ello explica los valores bajos del espesor de la pepita y por consiguiente de su peso.

Como ya se ha mencionado, algunos usos comerciales de la almendra dependen de sus caracteres físicos. Las pepitas alargadas y con buen espesor son las más adecuadas para producir filetes circulares uniformes (Schirra, 1997). Los cultivares más adecuados para producir este tipo de producto serían: 'Desmayo Rojo', 'Castilla', 'Fournat de Brézenaud' y 'Atocha'. Para producir bastones serían más adecuados 'Del Cid', 'Ferraduel', y 'Desmayo Largueta', por su forma alargada y su anchura. Como en cualquier otro árbol frutal, la calidad de la pepita depende en gran medida de las condiciones de cultivo, sobre todo del riego y el abonado (Felipe, 2000), por lo que la pérdida del peso y del espesor de la pepita en los almendras producidas en las condiciones de Meknès probablemente impediría su utilización para determinados usos industriales.

Aceite y proteína

Los resultados confirman el efecto de las condiciones ambientales y de cultivo en la expresión de estos componentes químicos (Kodad *et al*., 2004; Sánchez-Bel *et al*., 2001; Saura-Calixto *et al*., 1988), así como la relación que existe entre ambos componentes. Al parecer las condiciones ambientales y de cultivo del CITA de Aragón favorecieron la acumulación de aceite en la pepita, mientras que las del INRA de Meknès favorecieron la acumulación de proteína.

La acumulación de aceite y proteína en la almendra presenta un patrón sigmoidal desde la formación del fruto hasta la maduración, siendo esta acumulación más rápida durante la fase final del crecimiento del fruto (Cherif *et al*., 2004; Hawker y Buttrose, 1980). Aunque Egea *et al.* (2009) determinaron que el estrés hídrico no afectaba al contenido en proteína de la almendra, Sánchez-Bel *et al*. (2008) encontraron diferencias del contenido en proteína entre el cultivo en secano y en regadío. Para el contenido en aceite, Schirra y Agabbio (1989) hallaron que el contenido en aceite era más elevado en condiciones de regadío, mientras que Egea *et al*. (2009) señalaron un re-

sultado contrario. En el presente estudio, algunos cultivares ('Desmayo Largueta' y 'Del Cid') no mostraron diferencias significativas entre ambas localidades en cuanto a los contenidos en aceite y en proteína; algunos otros mostraron valores significativamente más altos del aceite y bajos de proteína en las condiciones de Meknès; otro grupo mostró valores más altos en aceite y bajos en proteína en la condiciones del CITA. Por ello, el posible efecto del riego sobre estos caracteres puede depender de las características del genotipo, ya que cada estudio se ha realizado con un diferente material vegetal.

Para la fabricación de pasta de almendra se prefieren almendras con un alto contenido en aceite, ya que ello implica una menor absorción de agua (Alessandroni, 1980) y el mantenimiento de su calidad. Los cultivares con valores elevados y más o menos estables del contenido en aceite en ambas estaciones, como 'Fournat de Brézenaud', 'Ferraduel' y 'Vivot', pueden utilizarse para la producción de pasta de almendra de buena calidad y para la extracción del aceite, tanto en condiciones de estrés como en regadío. Cultivares como 'Desmayo Rojo', 'Castilla' y 'Retsou' no deberían destinarse a la fabricación de pasta de almendra cuando se cultiven en condiciones áridas, ya que entonces el contenido en aceite baja considerablemente. Sin embargo, cultivares con bajo contenido en aceite se pueden destinar para la producción de harina de almendra y otros productos por su alto contenido en proteína (Longhi, 1952). 'Atocha' y 'Picantilli' pueden destinarse para este uso industrial en ambas condiciones de cultivo.

Estos resultados confirman el efecto de la zona de cultivo, con sus condiciones ambientales y culturales, en los aspectos físicos y químicos de la almendra, por lo que la utilización industrial de los distintos cultivares no sólo puede depender de cada uno de ellos, sino también de su procedencia, lo que debe tenerse muy en cuenta para la valorización de la producción en las distintas zonas de cultivo del almendro. Cabe destacar que los cultivares de cáscara dura o muy dura son los más adecuados para zonas áridas, así como que algunos cultivares parecen mejor adaptados a las condiciones de sequía, ya que no disminuye el peso de sus pepitas, como en 'Colorada' 'Desmayo Rojo', 'Del Cid', 'Retsou' y 'Vivot' o no varía su composición química, como en 'Desmayo Largueta' y 'Del Cid'.

Agradecimientos

Trabajo realizado en el marco del proyecto AGL2010-22197-C02-01 (Mejora genética del almendro), así como con la financiación de la actividad del Grupo Consolidado de Investigación A12 de Aragón (Adaptación y mejora del material vegetal para una fruticultura sostenible), École Nationale d'Agriculture de Meknès e Institut National de la Recherche Agronomique de Meknès. Se agradece la asistencia técnica de J. Búbal y O. Frontera.

Bibliografía

Abdallah A, Ahumada MH, Gradziel TM, 1998. Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123: 1029-1033.

Alessandroni A, 1980. Le mandorle. Panif. Pasticc. 8: 67-71.

Arteaga N, Socias i Company R, 2002. Heritability of fruit and kernel traits in almond. Acta Hort. 591: 269-274.

Askin MA, Balta MF, Tekintas FE, Kazankaya A, Balta F, 2007. Fatty acid composition affected by kernel weight in almond [(*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.]. J. Food Comp. Anal. 20: 7-12.

Aydin C, 2003. Physical properties of almond nut and kernel. J. Food Engineer. 60, 315-320.

Berger P, 1969. Aptitude à la transformation industrielle de quelques variétés d'amandier. Bull. Techn. Inf. 241: 577-580.

Cherif A, Sebei K, Boulhchina S, Kallel H, Belkacemi K, Arul J, 2004. Kernel fatty acid and triacylglycerol composition for three almond cultivars during maturation. J. Amer. Oil Chem. Soc. 81: 901-905.

Egea G, González-Real MM, Baille A, Nortes PA, Sánchez-Bel P, Domingo R, 2009. The effects of contrasted deficit irrigation strategies on the fruit growth and kernel quality of mature almond trees. Agric. Water Manag. 96: 1605-1614.

Felipe AJ, 2000. El almendro: el material vegetal. Integrum, Lérida.

Font i Forcada C, Kodad O, Juan T, Estopañán G, Socias i Company R, 2011. Genetic variability and pollen effect on the transmission of the chemical components of the almond kernel. Span. J. Agric. Res. 9: 781-789.

Godini A, 2002. Almond fruitfulness and role of self-fertility. Acta Hort. 591: 191-203.

Goldhamer DA, Viveros M, 2000. Effects of preharvest irrigation cutoff durations and postharvest water deprivation on almond tree performance. Irrig. Sci. 19: 125–131.

Goldhamer DA, Viveros M, Salinas M, 2006. Regulated deficit irrigation in almonds: effects of variations in applied water and stress timing on yield and yield components. Irrig. Sci. 24: 101-114.

Grasselly C, 1972. L'amandier: caractères morphologiques et physiologiques des variétés, modalité de leur transmission chez les hybrides de première génération. Tesis doctoral, Univ. Bordeaux, 156 pp.

Grasselly C, Crossa-Raynaud P, 1980. L'amandier. G.P. Maisonneve et Larouse, Paris, 265 pp.

Gülcan R, 1985. Almond descriptors (revised). IBPGR, Rome.

Hawker JS, Buttrose MS, 1980. Development of the almond nut (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb): anatomy and chemical composition of fruit parts from anthesis to maturity. Ann. Bot. 46: 313-321.

Hill SJ, Stephensen DW, Taylor BK, 1987. Almond yield en relation to tree size. Scientia Hort. 33: 97-111.

Kester DE, Gradziel TM, 1996. Almonds. En: J. Janick y J.N. Moore (eds.): Fruit breeding, vol 3, p. 1-97. John Wiley & Sons, New York, USA.

Kester DE, Hansche PE, Beres W, Asay RN, 1977. Variance components and heritability of nut and kernel traits in almond. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102: 264-266.

Kodad O, 2006. Criterios de selección y de evaluación de nuevas obtenciones autocompatibles en un programa de mejora genética del almendro. Tesis doctoral, Univ. Lérida.

Kodad O, Socias i Company R, 2008. Variability of oil content and of major fatty acid composition in almond (*Prunus amygdalus* Batsch) and its relation with kernel quality. J. Agric. Food Chem. 56: 4096-4101.

Kodad O, Socias i Company R, Gracia Gómez MS, Martínez Lázaro JM, Bonilla A, 2004. La composición de la almendra como criterio para su utilización industrial y como base para la selección en un programa de mejora genética. pp. 1094-1102. Actas III Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Pamplona, ISBN 86-688-7989-4.

Kodad O, Estopañán G, Juan T, Molino F, Mamouni A, Messaoudi Z, Lahlou M, Socias i Company R, 2010a. Plasticity and stability in the major fatty acid content of almond kernels grown under two Mediterranean climates. J. Hort. Sci. Biotechnol. 85: 381-386.

Kodad O, Juan T, Estopañán G, Messaoudi Z, Socias i Company R, 2010b. Efecto de la zona de cultivo sobre la calidad de la almendra en la cuenca mediterránea: caso de 'Ferragnès y Marcona en España y Marruecos. Ver. Frutic. 8: 26-33.

Longhi S, 1952. High-protein animal feed. It. Patent 470,433 (Chem. Abstr. 1953, 47: 10766).

Nanos GD, Kazantzis I, Kefalas P, Petrakis C, Stavroulakis GG, 2002. Irrigation and harvest time affect almond kernel quality and composition. Scientia Hort. 96: 249-254.

Nieddu G, Schirra M, Mulas M, 1989. The effects of irrigation on developmental processes in almond fruits. Irrig. Drain. 36: 137-141.

Sánchez-Bel P, Madrid R, Sánchez A, Valverde M, Romojaro F, 2001. La calidad de la almendra española. I. Fracción proteica. Cuad. Fitopatol. 67: 15-21.

Saura-Calixto F, Cañellas-Mut J, Soler L, 1988. La almendra: composición, variedades, desarrollo y maduración. INIA, Madrid.

Schirra M, 1997. Postharvest technology and utilization of almonds. Hort. Rev. 20: 267-292.

Schirra M, Aggabio M, 1989. Influence of irrigation on keeping quality of almond kernels. J. Food Sci. 54: 1642-1465.

Socias i Company R, Kodad O, Alonso JM, Gradziel TM, 2008. Almond quality: a breeding perspective. Hort. Rev. 34: 197-238.

Valverde MR, Madrid A, García L, 2006. Effect of the irrigation regime, type of fertilization, and culture year on the physical properties of almond (cv. Guara). J. Food Engin. 76: 584-593.

(Aceptado para publicación el 14 de octubre de 2011)

Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados in vitro

E. García*, P. Lorente, J.A. Marín, P. Andreu y A. Arbeloa

* Estación Experimental de Aula Dei-CSIC. Avda. Montañana 1005. 50059 Zaragoza. España.
E-mail: egarcia@eead.csic.es

Resumen

La necrosis apical aparece de forma habitual durante el cultivo in vitro de plantas leñosas y ha sido descrita en *Pistacia vera* desde los inicios de su cultivo in vitro. Es un problema complejo, ya que no se ha podido determinar su causa de forma definitiva a pesar de los numerosos trabajos realizados y limita enormemente su cultivo in vitro, por lo que la búsqueda de condiciones que controlen su aparición es de gran interés. En este trabajo se estudia la presencia de necrosis apical en diferentes medios de cultivo y el efecto de diferentes factores (adición de calcio, enfriamiento basal, número de brotes por frasco o frascos ventilados de mayor volumen) en la necrosis apical de brotes de pistacho in vitro. El medio DKW disminuye la incidencia de necrosis apical en comparación con los medios MS o WPM, posiblemente debido a que la concentración de calcio en el medio DKW es 3 veces superior que en los otros medios. Esto ha podido ocasionar la falta de efecto de la adición de calcio al medio DKW, en forma de gluconato de calcio, en la necrosis apical y en otros parámetros estudiados: porte del brote, tasa de multiplicación o número de entrenudos. Sin embargo, tanto el enfriamiento basal, o el menor número de brotes por frasco, como el uso de frascos ventilados y de mayor volumen, han disminuido la necrosis apical y mejorado el porte de forma significativa respecto al control, aunque no se encontraron diferencias entre ellos. Estos resultados se discuten en términos de que una mayor cantidad de medio de cultivo por brote y el aumento de la transpiración y el transporte de nutrientes pueden tener un efecto beneficioso en el cultivo in vitro del pistacho.

Palabras clave: Pistacho, gluconato de calcio, enfriamiento basal, número de brotes, ventilación.

Summary
Factors affecting shoot tip necrosis of *Pistacia vera* L. shoots cultured in vitro

Shoot tip necrosis is a common problem during in vitro culture of woody plants and was described in *Pistacia vera* right from the start of its culture. It is a complex problem whose cause could not be found yet, in spite of the numerous attempts already made, and limits to a great extent its tissue culture. In this work, pistachio shoot tip necrosis is studied in three different culture media, as well as the effect of different factors (Ca-gluconate, bottom cooling, shoot number or aeration) on shoot tip necrosis. DKW medium performed better than MS or WPM media, possibly due to its greater Ca concentration (up to 3 times more). This can be the cause of the lack of effect of Ca additions in the form of Ca-gluconate to DKW medium on shoot tip necrosis and on other parameters: shoot quality, multiplication rate or number of internodes. However, any of these factors: bottom cooling, shoot number per flask, or the use of vented jars with a bigger volume, had improved shoot tip necrosis impact and shoot quality in a significant way related to the control, although no significant differences among them were found. The results are discussed in terms of the beneficial effect on pistachio tissue culture of both higher quantities of medium per shoot and an increase of transpiration and nutrient transport through the shoot.

Key words: Pistachio, Ca-gluconate, bottom cooling, shoot number, aeration.

Introducción

La necrosis apical aparece de forma habitual durante el cultivo in vitro de plantas leñosas (Bairu *et al*., 2009) y ha sido descrita en *Pistacia vera* desde 1985 (Barghchi y Alderson, 1985). A pesar de existir diferentes hipótesis sobre las causas que provocan la necrosis apical, no se ha podido determinar su origen de forma definitiva (Bairu *et al*., 2009), lo que indica la complejidad del problema. En pistacho, la necrosis apical limita enormemente su cultivo in vitro y sus aplicaciones para su multiplicación y conservación, obligando a subcultivos frecuentes, por lo que la búsqueda de condiciones que limiten o controlen su aparición es de gran interés.

La necrosis apical se ha relacionado con numerosos factores entre ellos el calcio, para el que existen múltiples referencias bibliográficas donde el aumento de su concentración en el medio de cultivo alivia la incidencia de la necrosis apical de numerosas especies, incluida el pistacho (Barghchi y Alderson, 1996). Otro factor que se ha relacionado es el tipo de medio y la concentración de sus componentes, con resultados contradictorios, de manera que Bairu *et al*. (2009) concluyen que es la disponibilidad de los elementos del medio y no su concentración en el mismo lo que es importante. La ventilación de los cultivos, relacionada con la transpiración de los brotes, actuaría en este contexto de dos maneras, bien aumentando el flujo de nutrientes hacia la parte superior del brote, o bien evitando la acumulación en el frasco de cultivo de gases y compuestos volátiles que pueden afectar al brote, como el CO_2 o el etileno (De Proft *et al*., 1985; Podwyszynska y Goszczynska, 1998). Otro factor entre los relacionados con la necrosis apical es la frecuencia de subcultivos (Jain *et al*., 2009), que proporciona los nutrientes necesarios a los brotes evitando su agotamiento y favorece la eliminación de compuestos exudados por los brotes con una posible acción nociva.

En este trabajo se describe la incidencia desigual de la necrosis apical en diferentes medios de cultivo durante la tercera semana de cultivo, y se estudia el efecto de diferentes factores en la necrosis apical de brotes de pistacho cultivado in vitro.

Materiales y métodos

Micropropagación de *P. vera*

Brotes de *P. vera* cultivados in vitro durante más de dos años se subcultivaron en distintos medios de cultivo para su comparación: DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), MS (Murashige y Skoog, 1962) y WPM (Lloyd y McCown, 1980), añadiendo 0.5 µM IBA, 5 µM BA, 30 g l^{-1} de sacarosa, y 7 g l^{-1} de agar (Difco Bacto-agar) según el método descrito por García *et al*. (2010). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16 h con luz blanca proporcionada por fluorescentes "cool-white" y una intensidad de 35 µmol m^{-2} s^{-1} y temperatura de 24°C y se subcultivaron cada tres semanas. Se compararon los diferentes medios de cultivo atendiendo a: necrosis apical (%), número de entrenudos por brote y tasa de multiplicación (número de brotes a partir de un brote), a las 3 semanas del subcultivo. Se analizaron 56 brotes por tratamiento y se realizaron dos repeticiones. Los datos fueron analizados, según su distribución, con diferentes pruebas estadísticas: test de Kruskal-Wallis (número de entrenudos por brote y número de brotes por brote o tasa de multiplicación) y el test de proporciones "prop. test" (necrosis apical). Se utilizó el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2008).

Necrosis apical

Se han usado para este trabajo brotes de *P. vera* cultivados in vitro durante más de dos

años. Los brotes se multiplicaron en una cámara de cultivo en condiciones similares a las descritas anteriormente. Los brotes se subcultivaron cada 3 semanas en un medio DKW modificado con 0.01 g l^{-1} de ácido ascórbico (antioxidante).

Para estudiar el efecto de diferentes factores en la necrosis apical de los brotes, se aumentó la duración entre subcultivos a 6 semanas, ya que a partir de la tercera semana aumenta la aparición de necrosis apical. Se estudiaron 4 tratamientos comparados con el control, en el que se utilizaron frascos de cultivo de vidrio de 100 ml de volumen (Sigma, St. Louis, MO, USA) con tapas Magenta B-cap (Sigma) en los que se colocaron 7 brotes por frasco y 30 ml de medio de cultivo DKW modificado como se ha descrito anteriormente. Para evaluar el posible efecto del aumento de la concentración de calcio se añadió al medio gluconato de calcio (3 mM) en las mismas condiciones del control. Igualmente se estudió el efecto del enfriamiento basal; se creó un gradiente de temperatura creciente entre el medio de cultivo y el ambiente, lo que favorece la transpiración y el transporte de nutrientes. Los frascos de cultivo se colocaron en una superficie refrigerada, a 6°C por debajo de la temperatura ambiente de la cámara de cultivo, manteniendo las demás condiciones como en el control. Se estudió, además, el efecto del tipo de frasco de cultivo y la ventilación comparando el control con un frasco de polipropileno (Sigma) de mayor volumen (700 ml) con tapas provistas de una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro que permite el intercambio de gases, pero no la entrada de microorganismos, a los que se añadieron 100 ml de medio de cultivo y se colocaron 12 brotes por frasco. Por último, se estudió el efecto de la reducción del número de brotes por frasco: 5 brotes en lugar de los 7 brotes del control, de manera que cada brote tuviera una mayor cantidad de medio de cultivo disponible, manteniendo las demás condiciones como en el control.

Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento, excepto en el frasco de mayor volumen, que se realizaron 3, siendo el número inicial de brotes 35 (control, gluconato de calcio, enfriamiento basal), 36 (frasco de cultivo) o 25 (número de brotes). Se evaluaron diferentes parámetros en un número variable de brotes que dependió de la tasa de multiplicación durante el periodo de cultivo en cada tratamiento: control (88 brotes); gluconato de calcio (70 brotes); enfriamiento basal (75 brotes); frasco de cultivo (120 brotes) y número de brotes (59 brotes). Después de 6 semanas de cultivo se evaluaron diferentes parámetros: 1) la aparición de necrosis apical; 2) el porte del brote, asignando a cada brote una categoría: "Malo", si la planta presentaba necrosis apical y además presentaba un aspecto muy deteriorado, "Regular", si la planta presentaba los ápices amarillentos y "Bueno", si la planta presentaba crecimiento activo y sin síntomas de necrosis; 3) el número de entrenudos por brote y 4) la tasa de multiplicación durante el periodo de cultivo (número de brotes al final del periodo de cultivo por brote inicial). Los datos se analizaron según su distribución: el efecto de los diferentes tratamientos sobre la necrosis apical se analizó mediante la regresión logística, según un modelo lineal con errores binomiales, para obtener tablas de 'deviancia' que son análogas a las del análisis de varianza, utilizando la transformación "logit link function" a las probabilidades de los datos (logit p = [p/(1-p)]. El porte del brote se estudió mediante el análisis de tablas de contingencia utilizando el test de la Chi cuadrado. El número de entrenudos se analizó mediante un análisis de la varianza de una vía. Se utilizó el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2008).

Resultados y discusión

La necrosis apical de brotes de *P. vera* cultivados in vitro ha estado influida de forma muy significativa ($p<0.001$) por el medio de cultivo utilizado (Figura 1). El medio DKW ha mostrado la menor incidencia de necrosis apical, con un número medio de entrenudos superior a 6 y manteniendo una tasa de multiplicación de 2.5 brotes por brote en cada subcultivo, inferior a la tasa del medio WPM (3.5 brotes por brote), que presentaba sin embargo una proporción de brotes con necrosis apical superior al doble que el DKW (60%) y un menor número medio de entrenudos por brote (5), siendo estas diferencias altamente significativas ($p<0.001$). Por otra parte, el medio MS muestra una posición intermedia en el porcentaje de ápices necróticos, pero con la menor tasa de multiplicación (Figura 2).

Los medios de cultivo comparados difieren notablemente en su composición mineral. Dentro de los elementos minerales que más se relacionan con la presencia de necrosis apical se encuentran el boro y el calcio (Barghchi y

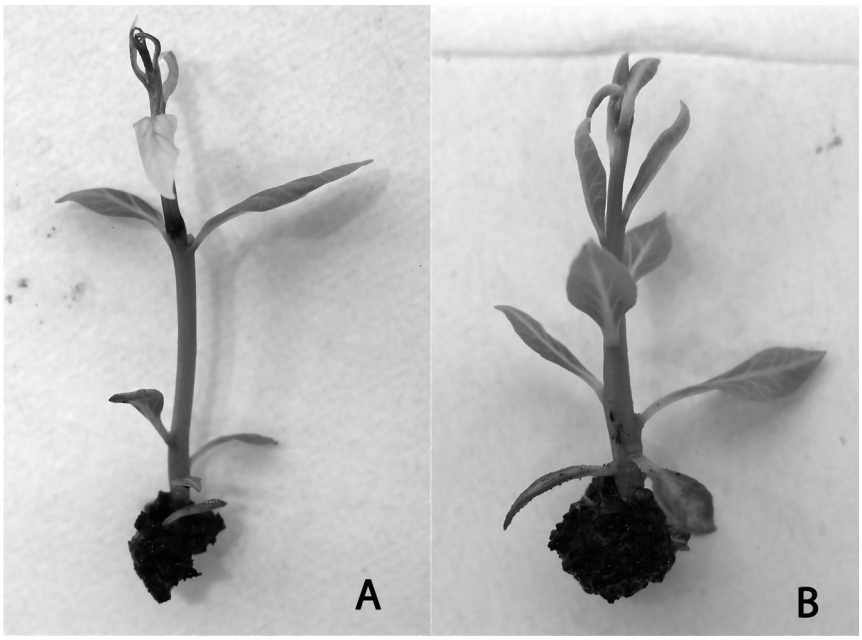
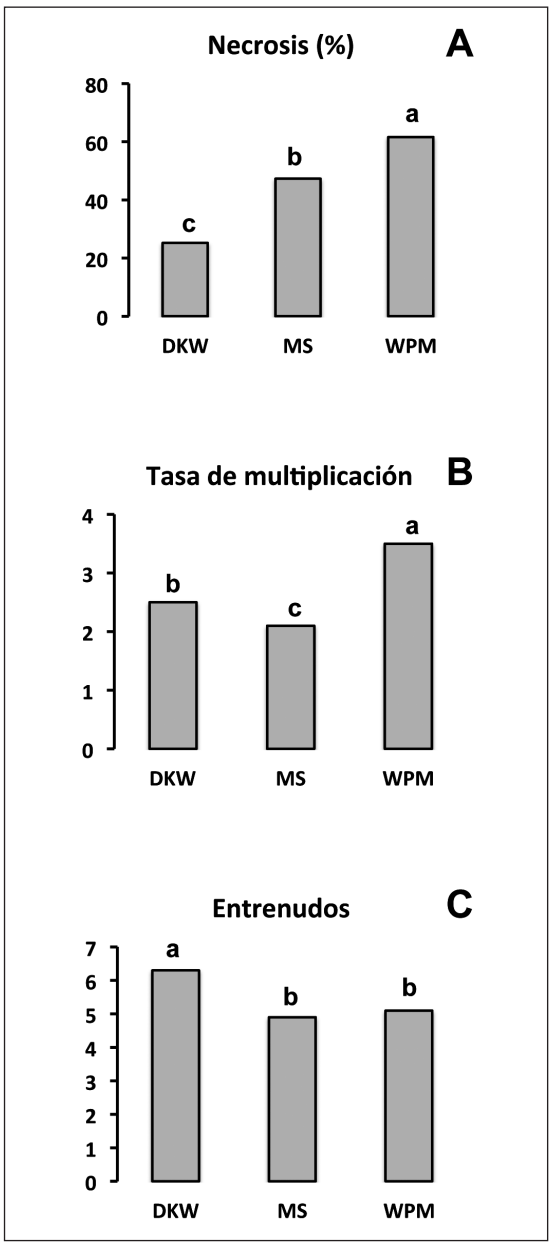


Figura 1. Brotes de *Pistacia vera* cultivados in vitro. A. Brote mostrando síntomas de necrosis apical. B. Brote sano.
Figure 1. Pistacia vera *shoots grown in vitro. A. Shoot showing shoot-tip necrosis. B. Healthy shoot.*

Alderson, 1989; George, 1993). El ion Ca^{2+} está involucrado en la morfogénesis in vitro y se requiere para muchas de las respuestas inducidas en las plantas por los reguladores de crecimiento (George, 1993). Una de las diferencias más notables entre los diferentes medios de cultivo empleados es la concentración de calcio, así, el medio DKW triplica su concentración respecto a MS y a WPM, sin embargo, el boro tiene una concentración si-



milar. La deficiencia de calcio en las plantas ha sido asociada con necrosis apical y un pobre crecimiento de las raíces en diversas especies cultivadas in vitro, como el pistacho (Barghchi y Alderson, 1989 y 1996) y otras plantas leñosas (Singha *et al*., 1990; Piagnani *et al*., 1996; Bairu *et al*., 2009; Thakur y Kanwar, 2011). La menor incidencia de la necrosis apical observada en el medio DKW podría estar relacionada con su mayor concentración en calcio (Figura 2).

La aparición de necrosis apical es un problema importante en cultivo in vitro, ya que obliga, bien a aumentar la frecuencia de los subcultivos, reduciendo el tiempo entre subcultivos a 3 semanas o menos para minimizar su incidencia, bien a la aplicación de diferentes tratamientos que disminuyan su presencia.

La necrosis apical se ha reducido de forma altamente significativa ($p<0.001$) gracias a la aplicación de distintos tratamientos, como el enfriamiento basal, el uso de un frasco ventilado de mayor volumen o la reducción del número de brotes, en los que las diferencias en el porcentaje de brotes con ápices necrosados fueron estadísticamente significativas con respecto al control (Figura 3). Sin embargo, la adición de gluconato de calcio no mostró una reducción apreciable en la necrosis apical (Figura 3). En *P. vera* la adición de Ca al medio de cultivo produjo una reducción en la incidencia de necrosis cuando los brotes se multiplicaron en medio MS, sin afectar a la multiplicación de brotes, y no así la adición de boro (Abousalim y Mantell, 1994; Barghchi y Alderson, 1996). El aumento de la concentra-

Figura 2. Comparación de diferentes medios de cultivo con brotes de *Pistacia vera*. A. Porcentaje de brotes mostrando necrosis apical. B. Tasa de multiplicación (número de brotes finales por cada brote inicial). C. Número de entrenudos por brote. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.001$) entre los medios de cultivo.
Figure 2. Culture media comparisons with shoot cultures of Pistacia vera. *A. Percentage of shoots showing apical necrosis. B. Multiplication rate (final number of shoots per shoot). C. Internode number per shoot. Different letters indicate significant differences ($p<0.001$) among culture media.*

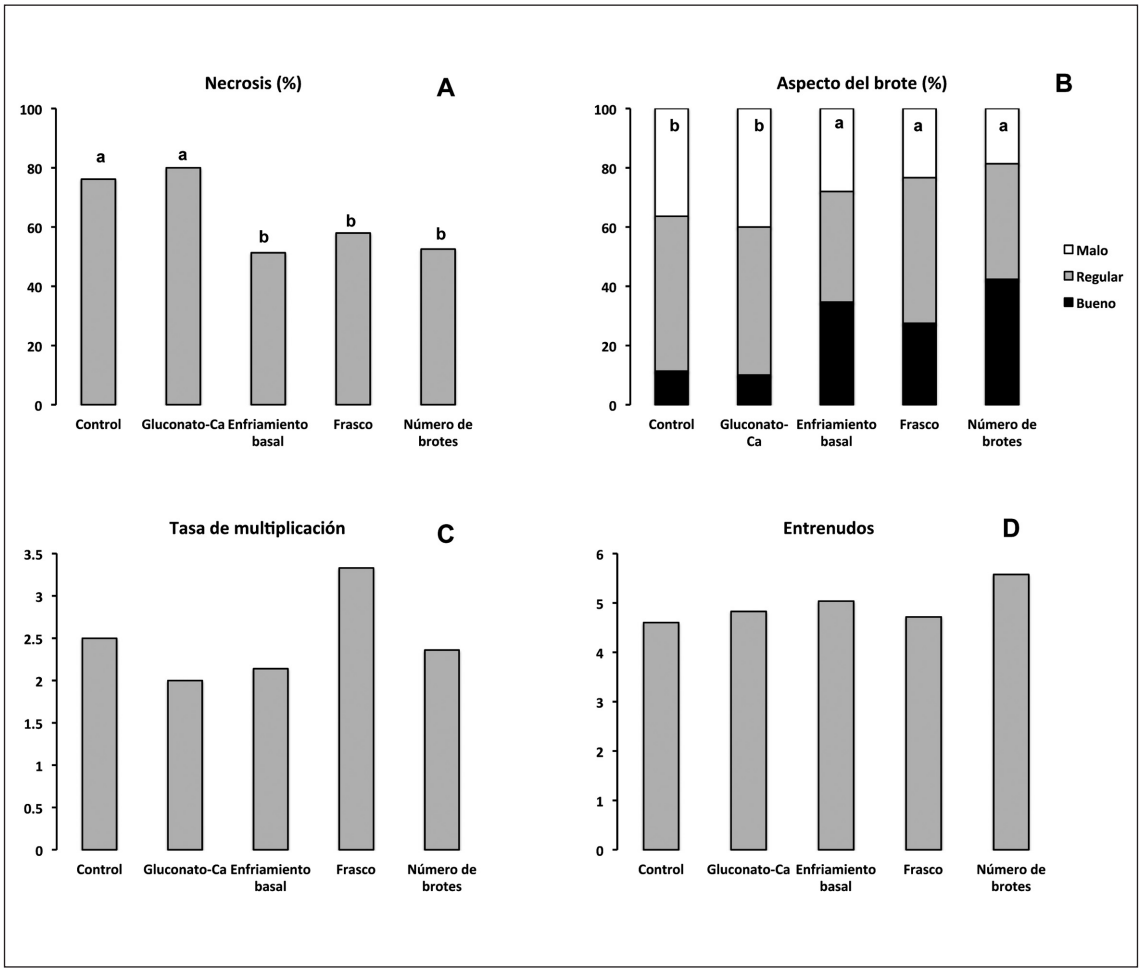


Figura 3. Efecto de los diferentes tratamientos en el cultivo de brotes de *Pistacia vera* in vitro, tras seis semanas de cultivo. A. Porcentajes de brotes que mostraban necrosis apical. B. Porcentaje de brotes en las diferentes categorías según su calidad para cada tratamiento. C. Tasa de multiplicación (número de brotes finales por brote). D. Número de entrenudos por brote. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.001$) entre los tratamientos.

Figure 3. Effect of different treatments on Pistacia vera *shoot culture in vitro. A. Percentages of shoots showing apical necrosis. B. Percentages of shoots from different categories depending on their shoot quality –low, intermediate or high. C. Multiplication rate (final number of shoots per shoot). D. Internode number per shoot. Different letters indicate significant differences ($p<0.001$) among treatments.*

ción de calcio no ha tenido un efecto sobre la necrosis en este trabajo lo que sugiere que el medio DKW tiene ya una concentración de calcio suficiente, de manera que la incidencia sobre la necrosis no ha mejorado con la adición de 3 mM de gluconato de calcio. Ésto viene reforzado al compararlo con los otros medios de cultivo empleados (MS y WPM) que

contienen una concentración de calcio tres veces menor que el medio DKW y en los que la necrosis apical fue muy superior (Figura 2).

Por otra parte, el menor número de brotes por frasco de cultivo (5 brotes frente a 7 en el control) ha tenido, asimismo, un efecto importante en la reducción de la necrosis apical, siendo el tratamiento que presentó el menor porcentaje de brotes con necrosis, con una diferencia muy significativa ($p<0.001$) respecto al control y al tratamiento con gluconato de calcio, aunque las diferencias no son significativas respecto a los tratamientos de enfriamiento basal y al frasco de cultivo de mayor volumen (Figura 3), quizá por el tamaño de la muestra. La mayor disponibilidad de medio de cultivo por brote cultivado, aumentada en el tratamiento con menor número de brotes (un 40%) y en el cultivo en frascos de gran volumen (94%) parece tener un efecto beneficioso, similar al aumento de la transpiración debido al enfriamiento basal o la aireación (Figura 3) en la necrosis apical. En otros trabajos la reducción de la humedad relativa o el aumento de la aireación en los frascos no produjeron ningún efecto sobre la necrosis apical en pistacho (Barghchi y Alderson, 1996). El volumen del contenedor usado para cultivo in vitro y el número de brotes cultivados puede afectar al crecimiento y morfogénesis in vitro probablemente debido a que produce cambios en la concentración de oxígeno, dióxido de carbono, etileno u otros volátiles (George, 1993). También producen un cambio en la proporción explanto/medio, explanto/aire o medio/aire lo que podría estar relacionado con la necrosis apical.

La calidad de los brotes obtenidos tras el cultivo durante 6 semanas en los diferentes tratamientos se valoró evaluando diferentes caracteres del brote además de la necrosis apical. El porte de los brotes obtenidos con los distintos tratamientos fue significativamente mejor en los tratamientos en los que también se redujo la necrosis apical: enfriamiento basal o número de brotes. Sin embargo, en el tratamiento del frasco de cultivo de mayor volumen y aireado, muchos de estos brotes presentaban un porte "regular", inferior a los tratamientos anteriores, lo que puede deberse a que este aumento de medio y de volumen por brote no esté tan equilibrado como en el caso de la reducción del número de brotes. En nuestras condiciones, la reducción del número de brotes supuso un aumento del 40% del volumen de aire por brote respecto al control, mientras que fue del 500% en el caso del frasco de mayor volumen. En general las condiciones óptimas tanto de la forma como del tamaño del frasco de cultivo son muy diferentes entre especies y varían también al variar otros factores como el tipo de material del recipiente, tipo de cierre o volumen del medio de cultivo (George, 1993).

La tasa de multiplicación después de las 6 semanas de cultivo bajo los diferentes tratamientos mostró que el cultivo en frascos de gran volumen con aireación presentaba la mayor tasa de multiplicación, obteniéndose un número de brotes final notablemente superior a los demás tratamientos, aunque estos fueran de menor calidad. El tratamiento de menor número de brotes por frasco de cultivo mostró una tasa de multiplicación similar al control pero con un mayor número de entrenudos por brote (Figura 3), aunque no muestran diferencias significativas en conjunto. Esto sugiere que la necrosis no afecta al desarrollo del brote desde el inicio, sino que aparecería tras un determinado grado de desarrollo. La mayor disponibilidad de medio de cultivo no parece tener una relación directa con el número de entrenudos que parecen depender de otros factores como los reguladores de crecimiento (Sghir *et al*., 2005), pero la tasa de multiplicación fue máxima en el frasco de mayor volumen, cuando la disponibilidad de medio de cultivo fue mayor.

Tanto la mejora de la transpiración de los brotes, como la mayor disponibilidad de medio

de cultivo por brote cultivado son beneficiosas para el cultivo de pistacho in vitro, reduciendo la aparición de ápices necrosados y mejorando la calidad del brote, con un color más verde y mayor turgencia. El aumento del gradiente de humedad relativa dentro del frasco, desde la superficie del medio de cultivo hasta la tapa del frasco, que favorece una mayor transpiración y mejora el transporte de nutrientes hasta la parte superior del brote, se ha realizado por una parte, mediante el enfriamiento basal, creando un gradiente térmico de 6°C entre la base del frasco y el ambiente de la cámara, y por otra, mediante la utilización de tapas con membranas porosas de 0.22 µm de diámetro de poro que permiten el intercambio de gases, pero no la entrada de microorganismos.

En este trabajo se ha estudiado la necrosis apical en diferentes medios de cultivo y el efecto de diferentes factores (adición de calcio, enfriamiento basal, número de brotes por frasco o frascos ventilados de mayor volumen) en la necrosis apical, en el desarrollo de los brotes de pistacho in vitro y en su calidad. Los resultados indican que un bajo porcentaje de brotes con necrosis apical y el desarrollo de brotes de buena calidad están asociados con un medio de cultivo enriquecido en calcio hasta un nivel óptimo, con una mayor cantidad de medio de cultivo por brote y con una mayor transpiración y transporte de nutrientes a través de los brotes.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2010-00053-C03-03 y por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43.

Referencias bibliográficas

Abousalim A, Mantell SH, 1994. A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in-vitro shoot cultures of *Pistacia-vera cv Mateur*. J Hortic Sci, 69: 357-365.

Bairu MW, Stirk WA, Van Staden J, 2009. Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell Tiss Organ Cult, 98: 239-248.

Barghchi M, Alderson PG, 1985. In vitro propagation of *Pistacia vera* L. and the commercial cultivars Ohadi and Kalleghochi. J Hortic Sci, 60: 425-430.

Barghchi M, Alderson PG, 1989. Pistachio (*Pistacia vera* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 5. Trees II. Bajaj, YPS (Ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp: 68-98.

Barghchi M, Alderson PG, 1996. The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L in vitro. Plant Growth Regulation, 20: 31-35.

De Proft M, Maene LJ, Debergh, PC, 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured in vitro. Physiol Plant, 65: 375-379.

Driver JA, Kuniyuki AH, 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience, 19: 507-509.

García E, Lorente P, Marín JA, Arbeloa A, Andreu P, 2010. Micropropagación e injerto in vitro de pistacho. ITEA, 106: 294-02.

George EF, 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 The Technology. Exegetics Ltd. England. 555 pags.

Jain N, Bairu MW, Stirk WA, Dolezal K, van Staden J, 2009. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. S Afr J Bot, 75: 117-121.

Lloyd G, McCown B, 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. HortScience, 15: 416.

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

Piagnani C, Zocchi G, Mignani I, 1996. The influence of Ca^{2+} and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill) in vitro shoot-tip necrosis. Plant Sci, 118: 89-95.

Podwysznska M, Goszczynska DM, 1998. Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and action, as well as calcium and magnesium on rose shoot rooting, shoot-tip necrosis and leaf senescence in vitro. Acta Physiol Plantarum, 20: 91-98.

R Development Core Team, 2008. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 1 June 2009. *http://www.R-project.org*

Sghir S, Chatelet P, Ouazzani N, Dosba F, Belkoura I, 2005. Micropropagation of Eight Moroccan and French Olive Cultivars. HortScience, 40: 193-196.

Singha S, Townsend EC, Oberly GH, 1990. Relationship between calcium ad agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 23: 135-142.

Thakur A, Kanwar JS, 2011. Effect of phase of medium, growth regulators and nutrient supplementations on in vitro shoot-tip necrosis in pear New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 39: 131-140.

(Aceptado para publicación el 3 de noviembre de 2011)

PREMIOS DE PRENSA AGRARIA 2011
DE LA
ASOCIACION INTERPROFESIONAL
PARA EL DESARROLLO AGRARIO

La Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA) acordó en Asamblea General celebrada en mayo de 1983, instaurar un premio anual de Prensa Agraria, con el objetivo de hacer destacar aquel artículo de los publicados en ITEA que reúna las mejores características técnicas, científicas y de valor divulgativo, y que refleje a juicio del jurado, el espíritu fundacional de AIDA de hacer de transmisor de conocimientos hacia el profesional, técnico o empresario agrario. Se concederá un premio, pudiendo quedar desierto.

Los premios se regirán de acuerdo a las siguientes

BASES

1. Podran concursar todos los artículos que versen sobre cualquier tema técnico-económico-agrario.
2. Los artículos que podrán acceder al premio serán todos aquellos que se publiquen en ITEA en el año 2011. Consecuentemente, los originales deberán ser enviados de acuerdo con las normas de ITEA y aprobados por su Comité de Redacción.
3. El jurado estará constituido por las siguientes personas:
   a) Presidente de AIDA, que presidirá el jurado.
   b) Director de la revista ITEA, que actuará de Secretario.
   c) Director Gerente del CITA (Diputación General de Aragón).
   d) Director del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.
   e) Director de la Estación Experimental de Aula Dei.
   f) Director del Instituto Pirenaico de Ecología.
4. El premio será anual y tendrá una dotación económica.
5. Las deliberaciones del jurado serán secretas, y su fallo inapelable.
6. El fallo del jurado se dará a conocer en la revista ITEA, y la entrega del premio se realizará con motivo de la celebración de las Jornadas de Estudio de AIDA.

CIHEAM

CENTRO INTERNACIONAL DE ALTOS ESTUDIOS AGRONÓMICOS MEDITERRÁNEOS
INSTITUTO AGRONÓMICO MEDITERRÁNEO DE ZARAGOZA

CIHEAM/IAMZ - Cursos 2010-11-12

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
PRODUCCIÓN VEGETAL	* MEJORA GENÉTICA VEGETAL	4 Oct. 10/10 Jun. 11	Zaragoza	IAMZ/UdL
	* OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA	26 Sep. 11/31 Mayo 12	Córdoba	UCO/JA/CSIC/COI/ INIA/IAMZ
	USO DE LA TELEDETECCIÓN PARA LA GESTIÓN DEL RIEGO	21-26 Nov. 11	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto Telerieg
	PRODUCCIÓN DE MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS	16-20 Ene. 12	Zaragoza	IAMZ
	USO DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN MEJORA VEGETAL	20 Feb./2 Mar. 12	Barcelona	IAMZ/IRTA/CRAG
	GESTIÓN DE MALAS HIERBAS EN LA AGRICULTURA ACTUAL	16-20 Abr. 12	Zaragoza	IAMZ/EWRS/SEMh/ IWSS
PRODUCCIÓN ANIMAL	PRODUCCIÓN CAPRINA	15-26 Nov. 10	Murcia	IAMZ/CAA-CARM
	CONSERVACIÓN Y GESTIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMALES	17-21 Ene. 11	Zaragoza	IAMZ/FAO
	APLICACIONES DE LA GENÓMICA EN MEJORA ANIMAL	21-25 Mar. 11	León	IAMZ/Univ. León
	PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN CLIMAS CÁLIDOS	9-14 Mayo 11	Zaragoza	IAMZ
	* NUTRICIÓN ANIMAL	3 Oct. 11/8 Jun. 12	Zaragoza	IAMZ/UZ/FEDNA/ UPM
	* MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	3 Oct. 11/29 Jun. 12 Barcelona	Valencia/ IVIA/INIA/IRTA/	UPV/UAB/IAMZ/ AGROALIMED

(*) **Cursos de Especialización de Postgrado** del correspondiente Programa Master of Science (*marcados con asterisco en el listado). Se desarrollan cada dos años:

- MEJORA GENÉTICA VEGETAL: 10-11; 12-13; 14-15
- OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA: 11-12; 13-14; 15-16
- NUTRICIÓN ANIMAL: 11-12; 13-14; 15-16
- MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN: 11-12; 13-14; 15-16
- PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE: 10-11; 12-13; 14-15
- MARKETING AGROALIMENTARIO: 11-12; 13-14; 15-16
- ACUICULTURA: 10-11; 12-13; 14-15
- GESTIÓN PESQUERA SOSTENIBLE: 11-12; 13-14; 15-16

Se destinan primordialmente a titulados superiores en vías de especialización de posgrado. No obstante se estructuran en unidades independientes para facilitar la asistencia de profesionales interesados en aspectos parciales del programa. Los participantes que cumplan los requisitos académicos pueden optar a la realización del 2º año para la obtención del Título Master of Science. El plazo de inscripción para el curso de Olivicultura y elaiotecnia finaliza el 15 de Abril 2011. El plazo de inscripción para los cursos de Nutrición animal, Mejora genética animal y biotecnología de la reproducción, Marketing agroalimentario y Gestión pesquera sostenible finaliza el 4 de Mayo 2011. El plazo de inscripción para los cursos de Mejora genética vegetal, Planificación integrada para el desarrollo rural y la gestión del medio ambiente y Acuicultura finaliza el 4 de Mayo 2012. El Estado Español reconoce el título Master of Science del CIHEAM otorgado a través del IAMZ como equivalente al título oficial de Máster del sistema universitario español.

Los cursos de corta duración están orientados preferentemente a investigadores y profesionales relacionados en el desarrollo de sus funciones con la temática de los distintos cursos. El plazo de inscripción para los cursos de corta duración finaliza 90 días antes de la fecha de inicio del curso.

Becas. Los candidatos de países miembros del CIHEAM (Albania, Argelia, Egipto, España, Francia, Grecia, Italia, Líbano, Malta, Marruecos, Portugal, Túnez y Turquía) podrán solicitar becas que cubran los derechos de inscripción, así como becas que cubran los gastos de viaje y de estancia durante el curso. Los candidatos de otros países interesados en disponer de financiación deberán solicitarla directamente a otras instituciones nacionales o internacionales.
No obstante, en algunos cursos coorganizados con otras instituciones pueden existir becas destinadas a candidatos de algunos países no miembros del CIHEAM. Se recomienda consultar el correspondiente apartado de becas en el folleto informativo que se edita específicamente para cada uno de los cursos programados.

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
MEDIO AMBIENTE	* PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	4 Oct. 10/10 Jun. 11	Zaragoza	IAMZ/UdL
	ECONOMÍA AMBIENTAL Y DE LOS RECURSOS NATURALES	7-18 Feb. 11	Zaragoza	IAMZ
	RESTAURACIÓN ECOLÓGICA DE RÍOS MEDITERRÁNEOS	19-24 Sep. 11	Zaragoza	IAMZ
	LOS INCENDIOS FORESTALES EN LA PERSPECTIVA DEL CAMBIO GLOBAL	13-17 Feb. 12	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto FUME
	SISTEMAS DE AYUDA A LA DECISIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA GESTIÓN MEDIOAMBIENTAL DE ZONAS RURALES	19-23 Mar. 12	Zaragoza	IAMZ
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS GEOESPACIALES EN ESTUDIOS AMBIENTALES	11-22 Jun. 12	Zaragoza	IAMZ
COMERCIALIZACIÓN	MARKETING DE PRODUCTOS ECOLÓGICOS	18-22 Oct. 10	Zaragoza	IAMZ
	INCORPORACIÓN DE LA CALIDAD Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA EN LOS PLANES DE MARKETING	4-8 Abr. 11	Zaragoza	IAMZ
	ESTRATEGIAS DE MARKETING PARA LOS PRODUCTORES AGRARIOS LOCALES	13-17 Jun. 11	Zaragoza	IAMZ
	* MARKETING AGROALIMENTARIO	3 Oct. 11/8 Jun. 12	Zaragoza	IAMZ
PESCA Y ACUICULTURA	* ACUICULTURA	18 Oct. 10/31 Mayo 11	Las Palmas de Gran Canaria	ULPGC/ICCM/IAMZ
	GESTIÓN DE LA SEGURIDAD EN MOLUSCOS BIVALVOS	27 Sep./1 Oct. 10	Santiago de Compostela	IAMZ/Univ. Santiago de Compostela/FAO
	CULTIVO DE ALGAS MARINAS: TÉCNICAS, USOS Y PERSPECTIVAS DE DESARROLLO	22-26 Nov. 10	Zaragoza	IAMZ
	HERRAMIENTAS PARA EL SEGUIMIENTO Y VIGILANCIA EN LOS SISTEMAS DE CONTROL DE LA PESCA	14-18 Mar. 11	Zaragoza	IAMZ/FAO
	MONITORIZACIÓN DE LOS EFECTOS AMBIENTALES DE LA ACUICULTURA	23-27 Mayo 11	Murcia	IAMZ/CAA-CARM
	* GESTIÓN PESQUERA SOSTENIBLE	17 Oct. 11/15 Jun. 12	Alicante	UA/MARM/IAMZ
	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y LA SEGURIDAD DEL PESCADO Y DE LOS PRODUCTOS DE LA PESCA	17-21 Oct. 11	Derio	IAMZ/AZTI-Tecnalia/ FAO
	ANÁLISIS DEL RIESGO SANITARIO EN ACUICULTURA	12-16 Dic. 11	Zaragoza	IAMZ
	AVANCES EN REPRODUCCIÓN DE PECES Y SU APLICACIÓN AL MANEJO DE REPRODUCTORES	23-27 Ene. 12	Castellón	IAMZ/CSIC-IATS
	SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN Y SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA	14-18 Mayo 12	Zaragoza	IAMZ

Información e inscripción. Los folletos informativos de cada curso se editan 6-8 meses antes de la fecha de inicio. Dichos folletos, así como los correspondientes formularios de solicitud de admisión pueden solicitarse a la dirección del IAMZ u obtenerse directamente de la página web:

Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza

Avenida de Montañana 1005, 50059 Zaragoza (España)
Teléfono +34 976 716000 - Fax +34 976 716001 - e-mail iamz@iamz.ciheam.org
www.iamz.ciheam.org

ASOCIACION INTERPROFESIONAL
PARA EL DESARROLLO AGRARIO

itea
Información Técnica Económica Agraria

CONCESIÓN DEL PREMIO PRENSA AGRARIA 2010 DE AIDA

Presidente
Ricardo Revilla Delgado

Vocales
Jesús Val Falcón
Dunixi Gaviña Iturriaga
José González Bonillo
Blas Valero Garcés

Secretario
Juan A. Marín Velázquez

Reunido el Jurado del Premio 2010 de Prensa Agraria de AIDA formado por D. Ricardo Revilla Delgado, Presidente de AIDA, D. Dunixi Gaviña Iturriaga, en representación del Director del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ), D. Jesús Val Falcón, Director de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), y D. Blas Valero Garcés, Director del Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC) y D. José González Bonillo, Director Gerente del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) que disculpan su asistencia, y actuando como secretario D. Juan A. Marín Velázquez, Director de ITEA, tal como establecen las bases de la convocatoria aprobadas en la Asamblea General de la Asociación celebrada en mayo de 1983, acordó premiar entre los artículos publicados en ITEA durante el año 2010 al siguiente:

Premio "Prensa Agraria": "Respuesta de la canola (*Brassica napus*) a diferentes sistemas de labranza de conservación en secano en la Meseta Purhépera, Michoacán, México" siendo sus autores M.A. Cepeda y B.L. Gómez.

Zaragoza 19 de Abril de 2011

EL PRESIDENTE DE AIDA
Ricardo Revilla Delgado

INSCRIPCIÓN EN AIDA

* Si desea Ud. pertenecer a la Asociación, rellene la ficha de inscripción y envíela a **Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario**. Avda. Montañana 930. 50059 Zaragoza.

Si elige como forma de pago la domiciliación bancaria, adjunte a la hoja de inscripción el impreso de domiciliación sellado por su banco.

Apellidos..... Nombre.....

Dirección postal .....

Teléfono..... Fax..... E-mail .....

Empresa .....

Área en que desarrolla su actividad profesional .....

Firma:

FORMA DE PAGO (COUTA ANUAL: 39 EUROS)

❑ Cargo a tarjeta VISA ó MASTERCARD

Número tarjeta: Válida hasta:

□□ □□□□□□□□□□□□□□

❑ Cargo a cuenta corriente o libreta (rellenar la domiciliación bancaria)

Sr. Director del Banco/Caja .....

Muy Sr. mío:

Ruego a Vd. se sirva adeudar en la siguiente cuenta corriente / Libreta (20 dígitos)

.....

que mantengo en esa oficina, el recibo anual que será presentado por la **"Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario".**

Atentamente,

Firmado: Sello de la Entidad: