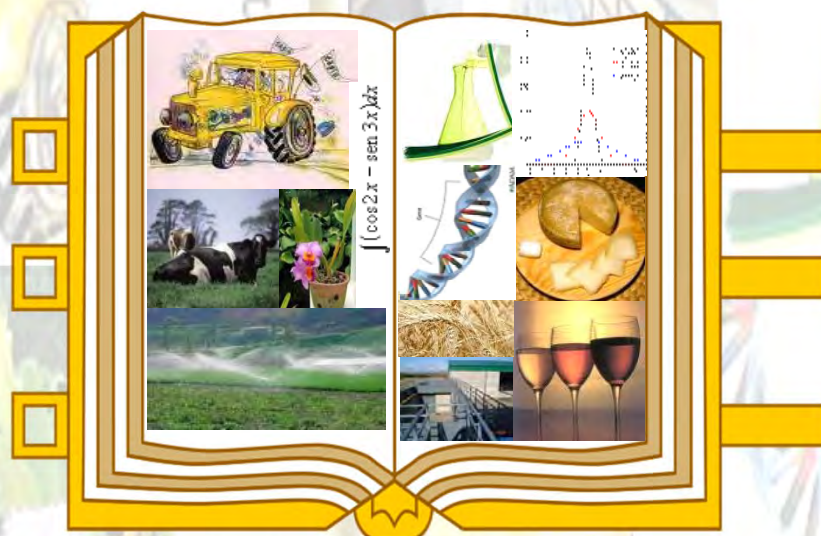


XII CONGRESO DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA AGRONÓMICA



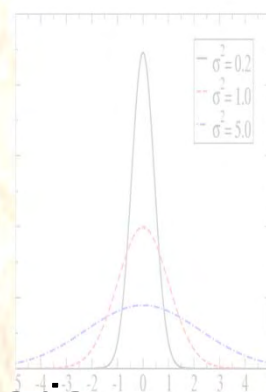
Libro de Actas

Editado por:
Bruna F. Silva de Sousa y Pilar García Rebollar

16 de junio de 2020

Escuela de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y
de Biosistemas

Universidad Politécnica de Madrid





XII CONGRESO DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas**

Madrid, 16 de junio de 2020

COMITÉ ORGANIZADOR

Pilar García Rebollar
Eva Miedes Vicente
Julia Martínez-Atienza Barthelemy
Kelly del Cisne Ulcuango Ulcuango
Bruna Fernanda Silva de Sousa

COMITÉ CIENTÍFICO

M^a Ángeles Adán del Río
Marta Albareda Contreras
Patricia Almendros García
María Alonso Ayuso
José Álvarez Sánchez
Pilar Baeza Trujillo
M^a Antonia Bañuelos Bernabé
Mercedes Flórez García
Nora Formoso-Rafferty Castilla
José María Fuentes Pardo

Ana Isabel García García
Paloma García Rebollar
M^a Estela Giménez Caminero
Pilar Medina Vélez
Adrián Menéndez Rey
Eva Miedes Vicente
Mónica Montoya Novillo
Santiago Moreno Vázquez
Luis Rey Navarro
María Jesús Villamide Diaz

Editado por:

Bruna Fernanda Silva de Sousa y Pilar García Rebollar

ISBN: 978-84-122114-0-5
Depósito legal: M-14194-2020



Madrid, 16 de junio de 2020

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la FUNDACIÓN PREMIO ARCE, al MINISTERIO DE AGRICULTURA ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE, a la EDITORIAL AGRÍCOLA ESPAÑOLA, a CEIGRAM, a la empresa NOVUS y a la Cátedra FERTIBERIA como patrocinadores de este evento.

ÍNDICE de TRABAJOS

SESIÓN C1	7
PAN DE HARINA DE TRIGO PARA CELIACOS: NUEVOS RETOS BIOTECNOLÓGICOS.....	9
VALIDACIÓN DE GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL ENDURECIMIENTO A ESTRÉS TÉRMICO EN PINÁCEAS: POSIBLE EFECTO DE MEMORIA EPIGENÉTICA	13
COMPARACIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN DE CONEJOS JÓVENES Y ADULTOS.....	17
BIOENERGY AS A SUSTAINABLE DEVELOPMENT STRATEGY IN VULNERABLE REGIONS	21
INFLUENCIA DEL OZONO EN EL CULTIVO DEL TRIGO	25
EL MÉTODO DE TERMINACIÓN DE LOS CULTIVOS CUBIERTA Y LA DISPONIBILIDAD DE AGUA AFECTAN A LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO	29
¿PUEDEN LOS T6SS (SISTEMAS DE SECRECIÓN) DE RIZOBIOS FACILITAR LA INTERACCIÓN CON LEGUMINOSAS?.....	33
SESIÓN C2.....	41
PARÁMETROS MICORRÍDICOS EN MAÍZ O TRIGO TRAS DIFERENTES TIPOS DE CULTIVOS CUBIERTA	43
THE WONDROUS SEARCH OF THE MYCOVIROME OF BOTRYTIS CINEREA	47
ENSILADO DE TYPHA: UNA OPORTUNIDAD PARA ALIMENTAR A LOS PEQUEÑOS RUMIANTES EN NIGERIA.....	51
VALORACIÓN NUTRITIVA DE LA CAPOTA DE ALMENDRA PARA LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES.....	55
ESTUDIO BIOTECNOLÓGICO DE RESPUESTA CELULAR A DISTINTAS PROTEÍNAS VEGETALES Y ANIMALES MEDIANTE TÉCNICAS DE VIABILIDAD COMPARADA.....	59
CONTROL AMBIENTAL EN UNA NAVE DE 180 TERNEROS MAMONES EN CARDEÑOSA (ÁVILA) ..	63
TALLER DE PODA DE VID: DISTINTOS MÉTODOS Y LABORES ACCESORIAS	67
ESTUDIO DE LAS CITOQUINAS SECRETADAS POR DOS LÍNEAS DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE COLON EN COCULTIVO CON LINFOCITOS Y EN TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA Y CON EL EXTREMO C-TERMINAL DE LA PROTEÍNA PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR (PEDF)	71
SESIÓN PÓSTERS.....	75
INMOVILIZACIÓN DE METALES PESADOS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ENMIENDAS EN EL SUELO CONTAMINADO DE UNA MINA ABANDONADA.....	77
ESTUDIO DEL CONSORCIO FUSARIA ASOCIADO A LA PODREDUMBRE VASCULAR DEL ESPÁRRAGO EN EL MUNICIPIO DE ARANJUEZ	81
CARACTERIZACIÓN DE LA RAZA DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. LACTUCAE</i> CAUSANTE DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DE LA LECHUGA EN NAVARRA.....	85
ENSILING INVASIVE TYPHA GRASS FOR ANIMAL FEED. AN OPPORTUNITY FOR LOCAL COMMUNITIES IN THE HADEJIA VALLEY (NIGERIA)	89
DETERMINACIÓN DE FÓSFORO ASIMILABLE EN UN SUELO AGRÍCOLA: EXTRACCIÓN Y MEDIDA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VISIBLE	93
DETERMINACIÓN MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES DEL ÓXIDO NITROSO EMITIDO POR UN SUELO AGRÍCOLA FERTILIZADO CON UREA.....	97

DETERMINACIÓN DE OLIGOELEMENTOS (CU, FE, ZN Y MN) TOTALES Y ASIMILABLES (DTPA-TEA) EN UN SUELO AGRÍCOLA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA ATÓMICA	101
ESTUDIO DE LA PRODUCTIVIDAD DE EXPLOTACIONES VACUNAS DE LECHE EN PAÍSES EN VÍAS DE DESARROLLO MEDIANTE UN SIMULADOR VIRTUAL DE GRANJAS (E-FARM)	105
NUEVOS DATOS SOBRE EL CONTROL DE AUTORIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE CANCEROSAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME A TRAVÉS DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE PIGMENT EPITHELIUM DERIVED FACTOR	109
APLICACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE SYNSEPALUM DULCIFICUM (SCHUMACH.) DANIELL.	113
ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD DE LA FRUTA DE SYNSEPALUM DULCIFICUM	117
PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE LA GLICOPROTEINA DE SYNSEPALUM DULCIFICUM.....	121
NOVEL APPROACHES TO ASSESS ANTIBODY RESPONSES AGAINST INFLUENZA VIRUS IN HUMAN POLYCLONAL SERUM SAMPLES: INFECTION VS. VACCINATION	125
CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN EL ACEITE AROMAS DEL SEGURA	129
ÍNDICE DE PALABRAS CLAVE	135
ÍNDICE AUTORES.....	137
ÍNDICE TUTORES.....	139

SESIÓN C1

PAN DE HARINA DE TRIGO PARA CELIACOS: NUEVOS RETOS BIOTECNOLÓGICOS

Gómez-Bravo Puerta, Daniel

Tutores: Garrido Arandía, María; Bañuelos Bernabé, María Antonia;
Dept. de Biotecnología – Biología Vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid
Correo electrónico (AUTOR): daniel.gomez-bravo.puerta@alumnos.upm.es

RESUMEN

La celiaquía es un problema de primer orden hoy en día. El único tratamiento disponible consiste en mantener una dieta libre de gluten de por vida. Por ello, la biotecnología juega un papel importante en la resolución de este problema, mediante la búsqueda de terapias orales (que permitan ingerir productos con gluten sin ninguna consecuencia) o la búsqueda de alimentos libres de gluten con las mismas propiedades nutricionales y sensoriales que los productos tradicionales. Una gran parte de los celíacos son diagnosticados tras varios años de vida y la supresión de los alimentos con gluten en la dieta repercute en la calidad de vida tanto a nivel social como nutricional, dada la pésima oferta actual del mercado.

Palabras clave: celiaquía, gluten, pan.

INTRODUCCION

La celiaquía es una enfermedad inmune que cursa con enteropatía. Esta tiene lugar ante la ingesta de gluten. Las células T del sistema inmune detectan inmunógenos en ciertos componentes del gluten, los cuales, al no ser hidrolizados por nuestras enzimas intestinales, pasan a la sangre y desencadenan una respuesta inflamatoria. Se presupone que tiene un componente genético, puesto que no es algo determinante en el desarrollo de la enfermedad, y su principal diagnóstico se realiza mediante la detección de anticuerpos inmunoglobulina A (IgA) anti-transglutaminasa tisular en sangre. La presencia de estas IgA indica la presencia de transglutaminasa intestinal en sangre debido al aumento anómalo de la permeabilidad intestinal por daño entérico, indicativo de celiaquía. La sintomatología comprende: malestar intestinal, fatiga crónica, retraso en el crecimiento y dificultad en la recuperación de enfermedades (Green et al., 2015).

En España, aproximadamente un 2% de la población (incluyendo intolerantes al gluten, sensibles al gluten, alérgicos al trigo y personas que no consumen gluten de forma voluntaria) siguen una dieta sin gluten, y este número (aproximadamente 500.000) aumenta un 15% anualmente. Los productos actuales del mercado disponibles para celíacos, a partir de cereales que no contienen gluten, suponen un sobrecoste del 716% sobre los productos tradicionales. En el caso concreto del pan, alimento esencial en la dieta española y mediterránea, el precio del pan tradicional es 1,72€/kg, mientras que el del pan sin gluten es de 12,33 €/kg, según la (*Asociación de Celíacos y Sensibles al Gluten. Comunidad de Madrid.*, sin fecha) Debido a esto, el gasto medio en alimentación de una persona celíaca se incrementa en 1040,41 €/año (ACSG), y dado que la celiaquía tiene predisposición genética, en una familia aumenta la prevalencia y con ello, el gasto. Por ello, sería de gran ayuda bajar el precio de los alimentos aptos para los mismos y que pudieran llevar una calidad de vida normal (*INFORME DE PRECIOS SOBRE PRODUCTOS SIN GLUTEN 2017*, sin fecha).

Las propiedades nutricionales de los alimentos sin gluten del mercado, en especial del pan, son de baja calidad. Dada la ausencia de gluten, se utilizan otros componentes para sustituir sus propiedades estructurales y aportar al pan sabor, textura y otras características sensoriales (como la elasticidad y esponjosidad de la masa). Estos son la goma xantana y otros hidrocoloides (Heredia-Sandoval et al., 2016).

El gluten es una proteína presente en la mayoría de los cereales, como trigo, avena o centeno y representa el 85% de la proteína total (11% de la masa) de la harina de trigo.

Se compone de gliadinas y gluteninas. Dentro de las gliadinas, las prolaminas son proteínas ricas en glutaminas y prolinas, difíciles de hidrolizar por nuestro intestino y que son reconocidas por el sistema inmune, provocando la alteración de la permeabilidad intestinal y el desencadenamiento de los síntomas típicos de la celiaquía (Tye-Din et al., 2018).

Existen diversas soluciones que presentan un futuro esperanzador para que las personas con celiaquía puedan llevar una vida totalmente normal. El objetivo de esta revisión es agruparlas, para tratar de dilucidar cuáles son los siguientes pasos que debe dar la biotecnología para ayudar a las personas con esta patología.

ENFERMEDAD CELIACA

Existen dos mecanismos que desencadenan la enfermedad. El primero se basa en la activación de los receptores DQ (La región del antígeno D se encuentra en el cromosoma 6 y una de sus isoformas es la DQ) de los antígenos leucocitarios humanos (del inglés: human leukocyte antigen; y sus siglas: HLA). En concreto, HLA-DQ 2 y HLA-DQ 8, presentes en células presentadoras de antígenos (CPA) y linfocitos T CD4+ específicos de gliadina. Cuando las prolaminas son desaminadas por la transglutaminasa 2 tisular (TGt) del endotelio intestinal, los péptidos resultantes (entre ellos 33-mer, que se considera el principal causante de la respuesta), producen la activación de las CPA. Estas, activan a las células T, que comienzan a segregar citoquinas proinflamatorias, como INF- γ (Tye-Din et al., 2018)

El segundo mecanismo enuncia que los péptidos desaminados son tóxicos antes de que alcancen los linfocitos T. En concreto, se ha descrito que el extremo N-terminal de la alfa-gliadina puede producir directamente la activación de cascadas de señalización e inducir la producción de interleucina 15, que estimula los linfocitos intraepiteliales, desencadenando una respuesta inmune innata, y en casos extremos, provocando la aparición de linfomas (Cerf-Bensussan et al., 2007).

Estos dos mecanismos desencadenan una respuesta inflamatoria que produce los síntomas anteriormente mencionados.

Para solucionar este problema, han surgido ciertos tratamientos, como la inhibición de la TGt, el bloqueo de la unión a HLA-DQ2/8, o el silenciamiento de las células T reactivas al gluten. Además, existen intentos del uso de anticuerpos anti-IL15, sin embargo, su aplicación clínica está en desarrollo y aún queda mucho por hacer hasta que consigan el efecto deseado (Tye-Din et al., 2018).

Por ello, la dieta libre de gluten de por vida, es el único tratamiento completamente efectivo (Green et al., 2015). Ante esto, la biotecnología ha propuesto, en los últimos años, dos tipos de soluciones: unas, encaminadas a permitir la ingesta de alimentos con gluten mediante el uso de tratamientos orales (en forma de comprimido), y otras, que proponen el tratamiento de los alimentos mediante proteasas para que el gluten presente no provoque reacción en el sistema inmune.

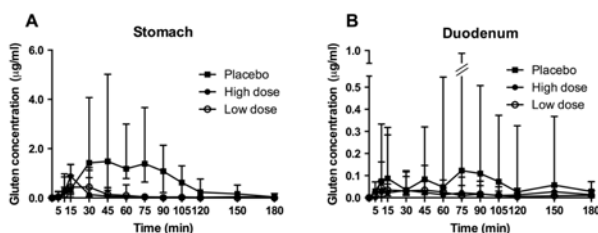
TRATAMIENTOS ORALES

Existen diversas enzimas, provenientes tanto de hongos como de bacterias, que parecen degradar los péptidos causantes de la respuesta inmune alterada contra las gliadinas, evitando el desarrollo de los síntomas.

Se ha llevado a cabo la búsqueda de diferentes proteasas mediante *screening* microbiológico, entre las que parecen haber tenido mayor éxito las prolil-endoproteasas (PEP) de *Aspergillus niger* y *Flavobacterium meningosepticum*. En concreto, la PEP de *A. Niger* (An-PEP) parece que proporciona resultados más prometedores, consiguiendo reducir la toxicidad de gluten en un 99% (Cerf-Bensussan et al., 2007) Diversos estudios se han realizado, dando a los pacientes tabletas de An-PEP antes de comer, y se ha

conseguido reducir la cantidad de gluten en duodeno y estómago (Figura 1) (König et al., 2017).

Figura 1. Niveles de gluten en el estómago (A) y duodeno (B) en presencia de An-PEP a diferentes concentraciones. (König et al., 2017)



Un grupo en la Universidad de Sevilla ha aislado y descrito una proteasa de *Chryseobacterium taeanense* que parece ser más eficaz que las descritas anteriormente, pero se requieren estudios *in vitro* e *in vivo* para su aplicación como tratamiento (oral o sobre alimentos) (Moreno *et al.*, 2019).

Sin embargo, ningún tratamiento ha conseguido permitir llevar una dieta con gluten, solo se ha conseguido evitar la contaminación por trazas (König et al., 2017). Con este objetivo algunas empresas han llegado a comercializar productos en forma de comprimido como es el caso de Tolerase G (*Digestive Enzyme Solutions | DSM Human Nutrition & Health*).

TRATAMIENTOS SOBRE ALIMENTOS

La regulación de la UE 41/2009, y la legislación de varios países, entre ellos España, dicta que aquellos alimentos libres de gluten deben tener un nivel inferior a 20 mg/kg de alimento. Este nivel se verifica mediante una prueba denominada ELISA R5, método reconocido por la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*).

Como puede observarse en la tabla 1, el uso de proteasas (Heredia-Sandoval et al., 2016) y bacterias lácticas han mostrado sus beneficios en la masa madre, ya que degradan los péptidos más tóxicos, y estas últimas los almacenan en el citoplasma. De esta forma, se reduce la toxicidad del gluten en los alimentos, y esto se comprueba mediante un ELISA-R5, viéndose reducida la cantidad de gluten.

En Italia, diversos grupos han tratado de crear pan a partir de harina modificada con An-PEP (E2) en presencia de bacterias lácticas, e *in vitro* las pruebas de ELISA-R5 obtuvieron resultados por debajo del umbral (20mg/kg). (Rizzello et al., 2007).

Tabla 1. Diferentes niveles de gluten alcanzados con dos conjuntos de bacterias lácticas diferentes (S1, S2) en combinación con enzimas de *Aspergillus oryzae*(E1) y *niger*(2) o ambas (E12). (Rizzello et al., 2007)

Dough or sourdough	Gluten concn (ppm)
CAD.....	74,592 ± 320
S1	20,315 ± 112
S2	12,362 ± 86
S2E1.....	4,895 ± 92
S2E2.....	1,055 ± 45
S2E12.....	12 ± 2

CAD (Chemically acidified dough). Fermentados a 37° durante 48 h. Fermentaciones independientes y analizadas 2 veces.

Los estudio *in vivo* realizados por Di Cagno y colaboradores (De Angelis et al., 2010) mostraron la seguridad de galletas y otros dulces hechos a partir de harina de trigo (tratados con dichas bacterias y enzimas). Estos fueron ingeridos por pacientes celíacos, durante 60 días. Sin embargo, no se evaluó la creación de un pan a partir de esta harina, y es necesaria la realización de análisis sensoriales para verificar sus características organolépticas.

La empresa italiana “Giuliani”, elaboró un pan llamado: “Giusto Sapori Tradizionali Bontà di Pane” en el que crearon un pan a partir de harina de trigo, en el que se trataba la harina de trigo con estas enzimas y con cepas bacterianas de *Lactobacillus* patentadas

(Scherf et al., 2018). Sin embargo, parece que no tuvo mucho éxito dada su poca publicidad en internet y su bajo nivel de ventas.

Por último, la creación de panes con contenido intermedio de gluten, también se ha intentado pero sin éxito, por no llegar al nivel establecido como libre de gluten (Rizzello et al., 2014). También se ha intentado con harina centeno (Walter et al., 2014) o combinando trigo y amaranto (Heredia-Sandoval, Calderón de la Barca y Islas-Rubio, 2016), pero las características siguen sin parecerse del todo al pan tradicional.

Por lo tanto, es necesaria la realización de estudios a largo plazo para verificar estos resultados y comprobar que no hay otras partes del gluten, como algunas gluteninas, que desencadenen la respuesta inmune, la estimulación de linfocitos T o la producción de IFN- γ . Todo ello acompañado del análisis de las características sensoriales de estos panes creados con harina de trigo modificada.

CONCLUSIONES

Las terapias orales y los tratamientos sobre alimentos han evolucionado mucho, y cada vez se está más cerca de crear un pan libre de gluten a partir de harina de trigo con las mismas propiedades que el pan tradicional. Los hitos conseguidos hasta ahora no deben ser en vano, y en un futuro, la combinación de ambas soluciones podrá permitir a los celíacos llevar una vida completamente normal, sin restricciones nutritivas, sobrecostes o disminución de la calidad de vida.

AGRADECIMIENTOS

María Garrido Arandía, Araceli Díaz Perales, María Antonia Bañuelos. A la ETSIAAB y el CBGP por orientarme en esta búsqueda.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación de Celíacos y Sensibles al Gluten. Comunidad de Madrid. Disponible en: <https://www.celiacosmadrid.org/> (Accedido: 27/04/2020).

Cerf-Bensussan, N. et al. (2007) «Oral proteases: A new approach to managing coeliac disease», *Gut*, pp. 157-160. doi: 10.1136/gut.2005.090498.

De Angelis, M. et al. (2010) «Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from triticum turgidum L. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases», *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), pp. 508-518. doi: 10.1128/AEM.01630-09.

Digestive Enzyme Solutions | DSM Human Nutrition & Health. Disponible en: <https://www.dsm.com/markets/human-nutrition/en/products/digestive-enzymes.html> (Accedido: 14/03/2020).

Green, P. H. R., Lebowitz, B. y Greywoode, R. (2015) «Celiac disease», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc., pp. 1099-1106. doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.044.

Heredia-Sandoval, N. et al. (2016) «Microbial Proteases in Baked Goods: Modification of Gluten and Effects on Immunogenicity and Product Quality», *Foods*. MDPI AG, 5(4), p. 59. doi: 10.3390/foods5030059.

Heredia-Sandoval, N. G., Calderón de la Barca, A. M. y Islas-Rubio, A. R. (2016) «Gluten degradation in wheat flour with *Aspergillus niger* prolyl-endopeptidase to prepare a gluten-reduced bread supplemented with an amaranth blend», *Journal of Cereal Science*. Academic Press, 71, pp. 73-77. doi: 10.1016/j.jcs.2016.07.015.

INFORME DE PRECIOS SOBRE PRODUCTOS SIN GLUTEN 2017.

König, J. et al. (2017) «Randomized clinical trial: Effective gluten degradation by *Aspergillus Niger*-derived enzyme in a complex meal setting», *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-13587-7.

Moreno Amador, M. de L. et al. (2019) «A new microbial gluten-degrading prolyl endopeptidase: Potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides», *PLOS ONE*. Editado por K. Sestak. Public Library of Science, 14(6), p. e0218346. doi: 10.1371/journal.pone.0218346.

Rizzello, C. G. et al. (2007) «Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: New perspectives for celiac disease», *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), pp. 4499-4507. doi: 10.1128/AEM.00260-07.

Rizzello, C. G. et al. (2014) «Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten», *Food Microbiology*. Academic Press, 37, pp. 59-68. doi: 10.1016/j.fm.2013.06.017.

Tye-Din, J. A., Galipeau, H. J. y Agardh, D. (2018) «Celiac disease: A review of current concepts in pathogenesis, prevention, and novel therapies», *Frontiers in Pediatrics*. Frontiers Media S.A., 6. doi: 10.3389/fped.2018.00350.

Walter, T., Wieser, H. y Koehler, P. (2014) «Degradation of gluten in rye sourdough products by means of a proline-specific peptidase», *European Food Research and Technology*. Springer Verlag, 240(3), pp. 517-524. doi: 10.1007/s00217-014-2350-5.

VALIDACIÓN DE GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL ENDURECIMIENTO A ESTRÉS TÉRMICO EN PINÁCEAS: POSIBLE EFECTO DE MEMORIA EPIGENÉTICA

Fañanás, Iris

Tutores: Cañal Villanueva, María Jesús; Lamelas Penas, Laura

ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

Dept. de Biología de Organismos y Sistemas. Facultad de Biología. Universidad de Oviedo.

Correo electrónico (AUTORA): iris.fananas.pueyo@alumnos.upm.es

RESUMEN

El actual contexto de cambio climático representa una amenaza para el rendimiento de las producciones agrícola y silvícola. En este escenario, el aumento de las temperaturas es uno de los factores que más perjudican a las plantas. Es por ello que ese trabajo se centra en la caracterización de la respuesta a nivel molecular. A día de hoy, los factores epigenéticos y los mecanismos de regulación de la expresión génica que median la aclimatación y el endurecimiento de especies forestales siguen siendo un campo poco estudiado. En el presente trabajo se planteó un ensayo dividido en dos fases de exposición prolongada a alta temperatura en plántulas de *Pinus radiata*, simulando un posible escenario de cambio climático. Los objetivos perseguidos fueron: la identificación de alteraciones en la expresión de genes candidatos de tolerancia a estrés térmico y la detección de la posible manifestación de una resistencia sistémica adquirida por la generación de una memoria epigenética. Para comparar la eficiencia de la aclimatación entre las fases, se analizó el perfil fisiológico de las plantas: daño de membrana, rendimiento fotosintético, contenido en azúcares y almidón, y concentración de compuestos fenólicos. Los resultados mostraron un cambio tanto en la dinámica como en la intensidad de la respuesta al estrés, siendo más efectiva durante la segunda exposición, lo que apoya la hipótesis del endurecimiento o adquisición de resistencia sistémica.

Palabras clave: *Pinus radiata*, aclimatación, endurecimiento

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que perciben continuamente los cambios en su ambiente, con el objetivo de poder adaptarse. De esta manera llegan a un nuevo estado de homeostasis por medio de 1) la *aclimatación* o *plasticidad fenotípica*, que representa cambios a corto plazo en la fisiología o morfología del individuo que pueden revertirse si remiten las condiciones estresantes, y 2) el *endurecimiento* o la adquisición de una resistencia sistémica por medio del desarrollo de una memoria del estrés.

El presente trabajo se centró en el estudio de la aclimatación de *Pinus radiata* en condiciones estresantes de alta temperatura con particular énfasis en la detección de alteraciones en la expresión de genes candidatos de tolerancia a estrés térmico, previamente identificados en Lamelas et al., (2019), y la evaluación del potencial establecimiento de una memoria epigenética (Yaish et al., 2018; Lamelas et al., 2019).

Con objeto de profundizar en el proceso de aclimatación se observaron los efectos del estrés sobre la permeabilidad de la membrana plasmática y el rendimiento fotoquímico del fotosistema II, dos de los componentes celulares más vulnerables a altas temperaturas. Por otro lado, se elaboró un pequeño perfil bioquímico comprendiendo metabolismo primario y secundario. Finalmente, se estudiaron los cambios en la expresión de genes que participan en la remodelación de la cromatina las histonas H2A y H2B; las enzimas *s-adenosilmetionina sintasa* (SAM) y *s-adenosil-l-homocisteina hidrolasa* (SAHH), que participan en procesos de transmetilación del ADN; y la enzima *E1 activadora NEDD8* (NEDD8), implicada en la reparación de roturas en la cadena de ADN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon un total de 15 plántulas de 6 meses de edad –divididas en 5 réplicas biológicas– y se seleccionó una temperatura de 45 °C para la simulación del escenario de estrés térmico (Lamelas et al., 2019). Para cumplir con los objetivos y observar tanto el proceso de aclimatación como un posible endurecimiento, las plantas experimentaron dos exposiciones o fases de estrés –primer (PE) y segundo estrés (SE) – espaciadas por un periodo de recuperación en condiciones control; de forma que la segunda exposición no se viera influida por el impacto de la primera. Los periodos de estrés térmico fueron recreados en una cámara climática, emulando una ola de calor de 5 días, para así poder observar estrategias de aclimatación a corto y largo plazo.

Se programó una simulación realista de los días que incluyó la regulación cíclica de la luz, la humedad y la temperatura. De este modo, el día comenzaba con aumento gradual de la intensidad lumínica durante una hora, recreando el amanecer, junto con una rampa de 5 h temperatura ascendente, desde los 15 °C hasta los 45 °C. Tras 6 h de exposición, se simulaba el atardecer y la temperatura disminuía de forma gradual hasta los 15 °C a lo largo de 5 h; disminuyendo también la intensidad de luz durante la última hora hasta condiciones de oscuridad. El periodo nocturno tenía una extensión de 8 h a la misma temperatura. El muestreo y toma de medidas se realizaron siempre al final de las 6 h de tratamiento térmico, en el día 1 (T1), el día 3 (T3) y el día 5 (T5). Como control (C), se tomaron muestras un día antes de empezar cada una de las fases.

El daño de membrana se cuantificó siguiendo el protocolo de Bajji et al. (2002), 70 mg de acículas maduras frescas por cada réplica biológica y tiempo de exposición fueron incubados durante 24 h a temperatura ambiente y 30 rpm en un agitador Ch-4103 (Infors AG). La conductividad máxima fue medida después de autoclavar durante 20 min a 1100 kPa y 121 °C, determinándose la liberación de electrolitos mediante la fórmula: $EL = (C_{24h} - C_{CONTROL24h}) / (C_{autoclave} - C_{CONTROL\ autoclave})$.

El estado fotosintético de las plántulas se evaluó con un fluorímetro de modulación de amplitud de pulso (Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Alemania), según el protocolo de Jesus et al. (2015). Al final de las 6h de cada tratamiento térmico y tras 20 min de adaptación a la oscuridad, las acículas maduras apicales de diez plantas representativas de los distintos grupos fueron expuestas a un flash de luz saturante durante 1s. Se midieron la fluorescencia mínima (F_o) en ausencia de luz capaz de producir efectos químicos (actínica) y la máxima fluorescencia (F_m) después del flash de luz saturante. Con ello se calculó la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_o$) y se determinó el parámetro de eficiencia del fotosistema II (F_v/F_m).

El perfil bioquímico de las plantas siguiendo los métodos espectrofotométricos descritos por Jesus et al. (2015). Cada protocolo requirió 10 mg de material vegetal liofilizado de 3 réplicas biológicas por fase de estrés y tiempo de muestreo, seleccionadas al azar. Para los azúcares solubles totales (TSS) y el almidón se utilizó el método de la antrona, mientras que el contenido de compuestos fenólicos fue determinado con el método de Folin-Ciocalteu. Las concentraciones se extrapolaron con rectas patrón de glucosa y ácido gálico, respectivamente.

Por último, la expresión génica se cuantificó a partir del ARN extraído de 15 mg de acículas liofilizadas de 3 réplicas biológicas/fase de estrés por cada tiempo de muestreo, escogidas al azar. Se empleó una columna de gel de sílice según el protocolo descrito por Valledor et al. (2014). La calidad e integridad del ARN se comprobó en gel de agarosa al 1%, cuantificándose su concentración mediante Picodrop® y comprobándose la ausencia de contaminación por ADN mediante PCR. Luego se obtuvo el ADN complementario y finalmente se realizó una PCR cuantitativa con 3 réplicas técnicas por

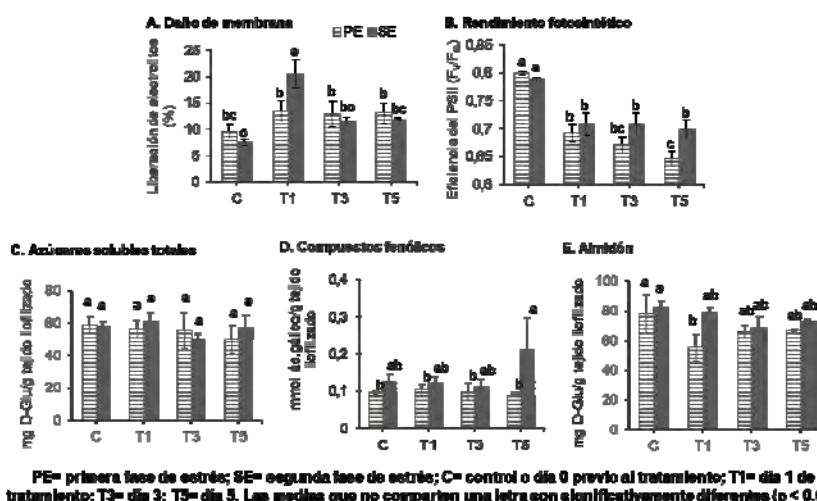
cada tiempo de exposición. Las reacciones se realizaron en un sistema CFX Connect Real Time PCR (Bio-Rad) con SsoAdvanced TM Universal SYBR ® Green Supermix (Bio-Rad, USA).

El análisis de datos se apoyó en el lenguaje de programación R. Se realizaron test post hoc empleando los paquetes Agricolae y EasyqPCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la primera fase de estrés (PE), la permeabilidad de la membrana plasmática se incrementó ($p > 0.05$) (Fig. 1A). En el segundo estrés (SE), las plantas experimentaron una nueva irrupción de la integridad de la membrana celular en el T1. Este efecto no fue observado los días T3 y T5, por lo que sugiere que las plantas mostraron una respuesta rápida de aclimatación. El pico inicial podría deberse a que las plantas arrastrasen daños del primer tratamiento, siendo más sensibles a las altas temperaturas. En cuanto al rendimiento fotosintético, se vieron dos tendencias diferentes: en el primer estrés hay un descenso ininterrumpido mientras que en el segundo no se observan diferencias por el paso de los días (Fig. 1B). Por lo tanto, los resultados mostraron que una eficiencia en la aclimatación era obtenida tras la segunda fase de estrés, lo que sugiere la obtención por la planta de una memoria frente al estrés, coincidiendo con los artículos de referencia (Yaish et al., 2018; Lamelas et al., 2019).

Figura 1. Parámetros fisiológicos y bioquímicos de las plántulas estresadas (*Pinus radiata*; n=15)



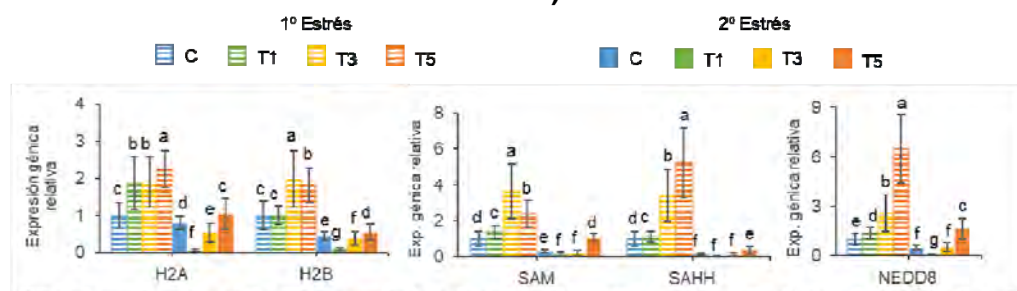
En relación al metabolismo primario, no se observaron diferencias significativas ni entre tiempos de exposición ni entre fases de tratamiento; por lo que los azúcares solubles probablemente no se encuentren involucrados en la respuesta de la planta (Fig. 1C). Este resultado difiere de los efectos descritos en los artículos consultados, donde se ha documentado que el contenido total en azúcares solubles tiende a disminuir en experimentos de estrés térmico a corto plazo (Escandón et al., 2016). Junto con el tamaño de las barras de error, esta disparidad en los resultados podría indicar que se trata de una respuesta de aclimatación muy variable entre plántulas. No obstante, la temperatura máxima en los experimentos de Escandón et al. (2016) fue de 40 °C, mientras que en el presente estudio se trabajó a 45 °C, por lo que no puede descartarse que el comportamiento de las plántulas difiera al tratarse de un estrés térmico superior. Respecto al metabolismo secundario, los compuestos fenólicos se mantuvieron en un estrecho rango de concentraciones en la primera exposición; pero sus niveles basales se incrementaron después de esta, lo que podría estar relacionado con la mejora de la aclimatación en la segunda fase de estrés. Además, se advierte un posible cambio hacia una estrategia a largo plazo entre T3 y T5 (Fig. 1D). De nuevo, dado el tamaño de la

barra de error, se trataría de una respuesta muy variable entre plántulas; aunque, en este caso, sí coincide con los resultados del artículo de referencia (Escandón et al., 2016). Por último, las células podrían haber utilizado sus reservas de almidón, principalmente al comienzo de la primera exposición a altas temperaturas, pero no es posible relacionar directamente este efecto con cambios en las tendencias de los metabolitos anteriores. Este efecto no fue observado en la segunda fase, lo cual refuerza la hipótesis del endurecimiento (Fig. 1E).

En cuanto a la expresión génica, se infirió que los cinco genes candidatos fueron relevantes durante la primera exposición, lo que apunta a una sucesión de eventos de remodelación de la cromatina y, considerando los resultados anteriores, al posible establecimiento de una memoria epigenética (Fig. 2). Este hecho justificaría por qué no se requirió un nivel de expresión similar durante la segunda fase. También se observa que, al ser genes relacionados con procesos de tolerancia al estrés, su expresión disminuye durante la recuperación. Otro hecho destacable son los puntos de inflexión detectados entre el tercer y el quinto día en ambos estreses. Estos cambios bruscos de tendencia apoyarían la hipótesis del uso de una estrategia a largo plazo.

Cabe destacar que las tendencias y niveles de expresión descritos en este ensayo contrastan con los de Lamelas et al. (2019). Las diferencias entre ambos trabajos podrían ser un ejemplo del dinamismo de la memoria y sus diferentes fases de regulación.

Figura 2: Expresión relativa normalizada de los 5 genes candidatos (*Pinus radiata*; n=15)



PE= primera fase de estrés; SE= segunda fase de estrés; C= control o día 0 previo al tratamiento; T1= día 1 de tratamiento; T3= día 3; T5= día 5. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados de caracterización del perfil fisiológico y bioquímico puede deducirse el establecimiento de una memoria de respuesta al estrés térmico. Los puntos de inflexión en algunas tendencias podrían ser indicativos de la modulación de la respuesta de la planta hacia una estrategia a largo plazo. Además, los cambios en la expresión de los genes candidatos sugieren que los mecanismos epigenéticos participan en el endurecimiento de *Pinus radiata* y refuerzan su potencial uso como biomarcadores de resistencia a alta temperatura en esta especie.

En el futuro, será necesario ampliar del periodo de recuperación para descartar el efecto de los daños provocados durante el primer tratamiento sobre los resultados de la segunda fase de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- Bajji M., Kinet J-M., Lutts S. 2002. Plant Growth Regul. 36:61.
 Escandón M., Cañal MJ., Pascual J., Pinto G., Correia B., Amaral J., Meijón M. 2016. Tree Physiol., 36, 63-77
 Escandón M., Valledor L., Pascual J., Pinto G., Cañal MJ., Meijón M. 2017. J Exp Bot 68, 3629-3641.
 Escandón M., Meijón M., Valledor L., Pascual J., Pinto G., Cañal MJ. 2018. Front. Plant Sci. 9, 485.
 Jesus C., Meijón M., Monteiro P., Correia B., Amaral J., Escandón M., Cañal MJ., Pinto G. 2015. Environ Exp Bot. 118, 56-66.
 Lamelas L., Valledor L., Escandón M., Pinto G., Cañal MJ., Meijón M. 2019. J Exp Bot, erz524
 Valledor L., Escandón M., Meijón M., Nukarinen E., Cañal MJ., Weckwerth W. 2014. Plant J Cell Mol Biol, 79(1):173-80.
 Yaish MW., Hirt H., Hohn B., 2018, Frontiers Media SA.

COMPARACIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN DE CONEJOS JÓVENES Y ADULTOS

Gutiérrez, Lucía; Sánchez, María; Sevillano, Fernando

Tutoras: Rebollar, Pilar.G.; Mattioli, Simona.

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

Correo electrónico (AUTORES): lucia.gutierrez.escudero@alumnos.upm.es;

maria.sanchezt@alumnos.upm.es; f.sevillano@alumnos.upm.es

RESUMEN

En una práctica de la asignatura de Biotecnología aplicada a la Producción animal, se usaron muestras de semen de cinco machos con edades diferentes (3 adultos y dos jóvenes) procedentes de la granja cunícola de los campos experimentales de la ETSIAAB. En primer lugar, se analizaron macroscópicamente los parámetros de color, presencia de sustancias no deseadas (sangre u orina) y volumen de cada muestra. Posteriormente, con ayuda de un microscopio óptico, se determinó la concentración, morfología, vitalidad y motilidad de los espermatozoides en cada muestra. La edad de los conejos pareció afectar a la calidad del semen ya que los jóvenes presentaron un eyaculado de peor color que los adultos, un exceso de gel y de espermatozoides con gota citoplasmática. Los eyaculados más cremosos y con mayor vitalidad correspondieron a los machos adultos. No obstante, los resultados no se pueden considerar concluyentes debido a la elevada variabilidad de los mismos, el bajo número de muestras analizadas, y a la distinta habilidad técnica o la subjetividad en las valoraciones por parte de los alumnos que hicimos esta práctica.

Palabras clave: *espermatozoide, valoración, eyaculado.*

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica que permite la difusión de material genético de calidad sin necesidad de transportar al animal. Esto permite, por ejemplo, criar animales que alcancen antes el peso deseado con un menor coste de alimentación. Por ello, es muy importante en la producción animal (Pardo et al., 2004). A partir de los años 80, la IA se ha convertido en uno de los métodos de reproducción más usados en producción cunícola (Mitjen et al., 1997). La evaluación de un eyaculado se realiza con el objetivo de disminuir la variabilidad de la calidad seminal sobre los resultados de fertilidad y prolificidad, y consiste en valorarlo previamente tanto macroscópicamente como microscópicamente. La calidad del semen está relacionada con factores que dependen de la raza, la salud, la genética, la alimentación y la edad. A su vez, depende del sistema de obtención, de conservación y almacenamiento que se aplique. Asimismo, las características seminales suelen estar relacionadas entre ellas y pueden cambiar según las condiciones del eyaculado, el tiempo que ha transcurrido desde su obtención, evaluación y utilización (De Loera et al., 2017).

La calidad seminal no es el único parámetro que determina la fertilidad de un macho. También se puede deducir con la capacidad de monta, la condición física o el tamaño testicular. Este último carácter se determina con frecuencia en el caso del toro, ya que se correlaciona positivamente con una mayor producción de esperma (Rebollar, 2017). Por otro lado, la edad del animal también juega un papel importante. Según Pardo et al. (2004), los machos entre los 5 y los 9 meses producen semen con una menor concentración de espermatozoides que los mayores de 10 meses. Nakagawa et al. (1996) clasificaron los conejos como inmaduros (3 semanas de vida), adultos jóvenes (de 8 a 10 meses de vida) y viejos (4-5 años). El envejecimiento del macho empeora la

16 de junio de 2020

calidad de los espermatozoides, lo que provoca un descenso de su capacidad fecundante. Teniendo en cuenta esta información, el objetivo principal de este trabajo de prácticas fue que los alumnos valoráramos las posibles diferencias en los parámetros de calidad de muestras de semen de conejos jóvenes y adultos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección del semen

La práctica se llevó a cabo en febrero de 2020. Se utilizaron cinco conejos machos (California x Neozelandés) con fenotipo californiano, uno viejo (4 años), dos adultos (~2 años) y dos jóvenes (7-8 meses). Los animales se encontraban en la granja experimental cunícola de la ETSIAAB bajo las mismas condiciones ambientales y de alimentación. La obtención y el procesado de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio anexo a la granja siguiendo el protocolo de Mattioli (2020). Para la recolección de muestras seminales se usaron vaginas artificiales, las cuales se componen de un tubo de PVC, unido mediante gomas elásticas a un globo de látex (formando una camisa). A continuación, se llenaron de agua caliente (45° C) y mediante una jeringa se inflaron hasta adquirir la apariencia de una vagina. Se lubricó la entrada con vaselina y se acopló un tubo colector de vidrio para recoger el semen. Se estimularon los machos mediante la presencia de una hembra, la cual se apartaba manualmente en el momento de la monta, colocando la vagina artificial justo debajo de ella para que el macho pudiese eyacular en su interior. Una vez recolectado el semen, se conservaron las muestras en una estufa a 37° C, para evitar mortalidad por shock térmico y protegerlos de la luz, sacándose cada vez que se iba a usar su contenido, pero manteniéndose bajo esas condiciones para evitar la degradación de los espermatozoides.

Análisis y evaluación seminal

Inicialmente, se valoraron macroscópicamente las muestras de semen puro, clasificándolas según su color en: MUY BUENO (blanco intenso lechoso), BUENO (blanco lechoso translúcido), MALO (color beige) y MUY MALO (color marrón). Se anotó si existía presencia de orina o gel de tapioca, y se midió el volumen de cada eyaculado mediante una pipeta Pasteur. Si alguna muestra presentaba gel, se retiró para evitar la aglutinación de los espermatozoides. Seguidamente, con una pipeta del mismo tipo se determinó el volumen de cada muestra.

A continuación, para estimar la concentración de cada eyaculado, se hizo una dilución 1:100 de las muestras (990 µl agua destilada + 10 µl semen). Se depositaron 10 µl del diluido en una cámara de Bürker y, bajo el microscopio óptico con el objetivo de aumento de 10x, se contaron las cabezas de espermatozoides que se encontraban en el interior de 4 de los cuadrados grandes de la cámara. Una vez obtenido el dato, se calcularon las concentraciones con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ espermatozoides contados en 4 cuadros}}{\text{volumen del cubo} * } \times \frac{100}{10} = \text{millones de espermatozoides/ml}$$

*=2,56

Para comprobar la subjetividad de la valoración por parte de los operarios, la concentración de espermatozoides en una de las muestras se analizó por dos personas.

Seguidamente, para analizar la morfología se realizó el test de integridad de la membrana o test HOST (*Hyposmotic Swelling Test*). En un tubo de ensayo se pusieron 10 µl de semen puro y 1 ml de una disolución hipotónica de glucosa (60 mOsm/l), y se incubaron en la estufa durante 30 minutos aproximadamente. Al sacar los tubos, se movieron ligeramente para homogeneizar su contenido y se colocó una gota de éste en un

portaobjetos, que se cubrió con un cubreobjetos. Se observaron al microscopio las diferentes muestras con el objetivo de aumento 40x. La observación consistió en contar 100 células analizando el estado de su cola, valorando la hinchazón y la curvatura de la misma, siendo más fértiles aquellos cuyas colas estaban más hinchadas y curvadas. También se evaluó si presentaban gota citoplasmática.

Posteriormente, para determinar la vitalidad se pusieron 10 µl de semen puro y 10 µl de eosina en un portaobjetos, se cubrieron con un cubre y se observaron al microscopio con el objetivo de aumento 40x. La eosina es un colorante rosado que ayuda a diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos. Éstos últimos permiten el paso de colorantes a través de sus membranas, por lo que se observan teñidos al microscopio (Sánchez y Zamora, 2016). Con ayuda de un *counter* se contaron 200 espermatozoides en total, apuntando el número de los que presentaban la cabeza incolora (es decir, aquellos que estaban vivos al tener la membrana intacta), para después estimar el porcentaje total de espermatozoides viables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 recoge los resultados obtenidos de cada muestra seminal. En cuanto al color, el macho más viejo presentó un color beige y de textura espesa, los dos adultos un color blanco lechoso intenso y ambos machos jóvenes un color blanco lechoso translúcido, que se valoraron como malo, muy buenos y buenos, respectivamente. Los machos jóvenes presentaron gel y los adultos no. No se observó la presencia de sangre, orina u otras sustancias no deseadas. Hubo diferencias en el volumen de las distintas muestras, siendo la del animal más viejo la menor, aunque en general, presentaron volúmenes normales para esta especie (Arias-Álvarez y Rebollar, 2017). La muestra de uno de los jóvenes quedó seriamente reducida al retirar el gel y, junto con la del viejo, fue descartada para el resto de análisis.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la valoración de muestras de semen de conejos de edades diferentes

Edad del animal	Color ¹	Presencia de gel	SND ²	Volumen (ml)	Concentración (millones spz ³ /ml)	HOST ⁴ (%)	Vitalidad (%)	Gota citoplasmática
viejo	Malo	NO	NO	0,25	42	-	-	-
adulto	Muy bueno	NO	NO	0,90	191	50	40	NO
adulto	Muy bueno	NO	NO	0,75	97,60	90	75	NO
joven	Bueno	SÍ	NO	0,75	70,30/170 ⁵	85	0	SI
joven	Bueno	SÍ	NO	0,10	-	-	-	-

¹ Muy Bueno (lechoso intenso), Bueno (lechoso translúcido), Malo (beige) y Muy Malo (marrón). ² Sustancias no deseadas; ³ Espermatozoides; ⁴ Test de hipo-osmolaridad para valorar la integridad de la membrana. ⁵ Muestra analizada por dos operarios.

Respecto a la concentración de espermatozoides, el valor medio en eyaculados de conejos está en torno a 500-800 millones spz/ml (Arias-Álvarez y Rebollar, 2017), y en este estudio se obtuvieron valores más bajos. En el caso de la muestra analizada por dos operarios se produjo una diferencia importante en los resultados que pone en evidencia la habilidad técnica (en el pipeteo, en el propio recuento...) la cual fue muy distinta entre operarios o la subjetividad en las valoraciones.

Respecto al test de integridad de membrana (HOST), los valores obtenidos fueron aceptables de acuerdo con el protocolo de Mattioli (2020). Sin embargo, en relación a la vitalidad, los resultados no fueron los esperados (Mattioli, 2020). La dificultad para observar un número aceptable de espermatozoides vivos pudo deberse a la manipulación

que sufrieron las muestras durante toda la sesión (hay que tener en cuenta que fue la última prueba que se realizó). Posiblemente, se hubieran obtenido mejores resultados sin manipular tanto las muestras, e incluso realizando las pruebas bajo una cámara de flujo. Por último, la presencia de gotas citoplasmáticas en la muestra de semen de uno de los jóvenes hubiera sido un motivo de descarte de ese eyaculado para usarse en inseminación artificial. Tal y como describe De Loera et al. (2017), un alto porcentaje de espermatozoides con gota citoplásmica indica la inmadurez de este macho, ya que sus espermatozoides no han terminado de completar la espermatogénesis liberando dicha gota antes de ser eyaculados.

CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo de prácticas, se concluye que, a pesar del escaso número de muestras analizadas, parecen existir diferencias en la calidad del semen debidas a la edad de los animales que afectan sobre todo al color, volumen y presencia de gel. Sin embargo, y haciendo extensible esta conclusión a todos los demás parámetros analizados, debido al bajo número de muestras analizadas, al factor operario (cada alumno valoró una muestra diferente), y a la falta de tiempo para realizar los análisis de una forma minuciosa y contrastada, fue imposible confirmar la existencia de diferencias en calidad seminal entre machos jóvenes y adultos. Por consiguiente, sería necesario realizar estos análisis con un número mayor de muestras y un diseño experimental adecuado que contenga una población representativa de los machos presentes en una granja de conejos, para confirmar las diferencias en calidad seminal con respecto a la edad de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

Esta práctica ha sido posible gracias al personal docente y laboral de la ETSIAAB, y a la colaboración del personal docente invitado de la Università degli Studi di Perugia.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias-Álvarez M. y Rebollar P.G. 2017. Biotecnología de la reproducción en lagomorfos. En: Biotecnologías de la reproducción aplicadas a especies de interés veterinario. Monografías INIA: Serie Ganadera nº5. Ed: INIA, O.A., M.P. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- De Loera Y., García-Contreras A., García-Artigas C. 2017. Análisis y criopreservación del semen. En: Biotecnologías de la reproducción aplicadas a especies de interés veterinario. Monografías INIA: Serie Ganadera nº5. Ed: INIA, O.A., M.P. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- Mattioli, S. 2020. Assessment of Rabbit Semen Quality: differences between young and old rabbit bucks. En: https://moodle.upm.es/titulaciones/oficiales/pluginfile.php/7964094/mod_resource/content/2/PRACTICE%20rabbit%20spermatozoa.pdf. Fecha de consulta: febrero 2020.
- Mitjen, P., Pizzi, F. 1997. Efecto del nivel alimenticio y proteína del pienso en la libido y características del semen del conejo. *Lagomorpha: revista de la Asociación Española de Cunicultura* 94,18-21.
- Nakagawa, Y., Hayashi, K., Yamamoto, N., & Nagashima, K. (1996). Age-related changes in biomechanical properties of the Achilles tendon in rabbits. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 73(1-2), 7-10.
- Pardo, M. D. L. L. G., Andrés, I., Caselles, P., García, R. L. (2004). Estudio de la edad de los machos de conejo en la inseminación artificial. *Boletín de cunicultura lagomorpha* 135, 17-25.
- Rebollar, P.G. 2017. Fisiología de la reproducción en el macho. En: Biotecnologías de la reproducción aplicadas a especies de interés veterinario. Monografías INIA: Serie Ganadera nº 5. Ed: INIA, O.A., M.P. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- Sánchez A., Zamora P. 2016. Efecto del medio hipoosmótico sobre la vitalidad espermática en semen canino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27 (2), 288-293.

BIOENERGY AS A SUSTAINABLE DEVELOPMENT STRATEGY IN VULNERABLE REGIONS

Tornel, Rossana

Tutora: Iglesias, Eva

Dept. de Economía. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid
Correo electrónico (AUTORA): rossana.tornel.vazquez@alumnos.upm.es

ABSTRACT

Increased deforestation and smoke poisoning are severe problems people face in the Hadejia Valley (Nigeria), both caused by extensive use firewood. In addition to this, the invasion of *Typha* grass in water canals and lands has caused negative economic and health impacts. The *Typha* Project has developed and seeks to implement a novel technology that uses *Typha Spp.* as a raw material to produce biogas, in order to reduce the mentioned problems. The present work shows a characterization of households in the study area that will help to assess the needs of the region in terms of energy, the socioeconomic characteristics and the dynamics that can be decisive in the adoption and maintenance of this novel technologies. Survey results were provided by *Typha* project research group who conducted two different questionnaires, the Household Head, and the Wife Questionnaire. Results from 277 questionnaires were analyzed, 120 for women and 157 for men. While we find that local communities are rather similar, our findings reveal significant differences between men and women.

Keywords: *biogas, Typha, gender*

INTRODUCTION

Typha is an invasive plant that grows in the canals, rivers and agricultural land of the Hadejia Valley, Jigawa State, Nigeria. The invasion extends over approximately 400 km, from the Kano River Irrigation Project to the Nguru wetland, especially affecting the Hadejia Valley (NAERLS, 2019). The appearance of the *Typha* has caused negative impacts such as the reduction of productivity in the rice lands, blocking of the channels and hindering navigation and fishing activities, causing floods due to the obstruction of the channels and affecting the water infrastructure. It also promotes the persistence of waterborne diseases, such as malaria, which is the leading cause of death in Nigeria (Iglesias et al., 2018). In addition to the difficulties caused by *Typha*, local communities also face problems such as deforestation, caused mainly using firewood for cooking. Related to this, firewood smoke poisoning is the third leading cause of death in Nigeria which particularly affects women and children. *Typha*'s invasion problem may become the solution to the problems just mentioned. It is proposed to produce affordable and clean energy for homes from *Typha*. It is proposed to give use to the plant to generate biogas and reduce poisoning and deforestation due to firewood consumption. The *Typha* Project has developed and seeks to implement a novel technology that uses *Typha* as a raw material to produce biogas based on a model of selected microorganisms in the rumen. The present work shows a characterization of local communities in the study area in order to assess the needs of the region in terms of energy, the socioeconomic characteristics and the dynamics that can be decisive in the adoption and maintenance of the *Typha* Project.

STUDY AREA

The survey was applied in 7 different communities (Akubushi, Auyo, Auyokayi, Furawa, Gatafa, Marina and Yamidi) that belong to Auyo Local Government Area in Jigawa State, Nigeria.

METHODOLOGY

We use descriptive statistics to analyze survey results provided by the Typha Project (2017-2020). The criteria for selecting the communities are based on the proximity to the affected area in the water channels due to the invasion of the Typha. In addition, other communities that were remote were selected to evaluate various situations. The survey was conducted at the household level. The respondents were randomly selected from the Water User Association members to answer a face-to-face questionnaire. To address gender issues, two different questionnaires were applied, the Household Head and the Wife Questionnaire. 312 questionnaires were applied, of which 277 were valid, 120 for women and 157 for men.

The questionnaire is made up of 5 sections: Personal and family data, Typha invasion and impact, decision making and collective action, Energy sources, and Adoption of biogas technology based on Typha. Both questionnaires share the same structure, but specific questions that directly concern women have been added. Since women are usually the most affected and can also be the main agents of change, a Welch's t-test is conducted to test whether perceptions that women have about firewood problems and biogas adoption differ from men.

HOUSEHOLD CHARACTERIZATION

Commonly a household includes the husband (head), wife-wives, children and any other person that lives and shares food with them. A home can be made up of more than one family because sons, even if they are married, can live in the same house as their parents with their own family. For biogas, family participation will be essential for the adoption of the project since the maintenance of the biodigester system requires effort and time that must be included in the household's daily activities. Besides, it is essential to know the size of the home because it is a determinant of energy consumption needs. According to the data obtained, the average household size is 13 people.

The mean age of male and female in the study area was found to be 42 and 50 years respectively. The males are therefore found to be younger than females. But considering the social context, it is possible that the females don't know their real age, or they declare the husband's age instead of their own age.

The most frequent economic activities in the region are agriculture, livestock and petty trading, which are usually carried out by men. Women's work focuses on household activities. Also, 43% of women sell vegetables and various crops, especially women interviewed in Auyo, Gatafa, and Marina communities. 25.8% is dedicated to the care of livestock; 56.25% of women interviewed in Gatafa are engaged in this activity.

Most households (54.77%) live in extreme poverty with an income between 50,000 and 150,000 NGN per month (1 EUR = 403.5 NGN). A large percentage of households (32.48%) also live on less than 50,000 NGN per month. This is equivalent to 0.317 euros per capita per day.

The food source in the households come from own crop production while the purchase of food is a minor source. As to self-produced meat and milk, only 1.91% of men consider meat as an important food source and only 0.64% mention milk as the second most important source of household food.

Local population also suffers severe energy poverty with only 57% of communities having access to electricity. In the region, it is common that the persons use sources of energy to cook like charcoal and biomass while for lighting, the most common source is solar energy, followed by electricity even if it is not available for everyone.

Those who are responsible for the task of collecting firewood are mainly men and children, although many of the people surveyed buy firewood because they claim that no member of the household collects firewood (58.60%). This expense represents 6 -12% of household income per week. Most men (41.40%) spend 2 hours per week to collect firewood.

Women cook on average for 15 people a day and on average they use 2.20 hours per day. Most women do it in traditional cookstoves which are largely inefficient and cause severe smoke related health problem. Household consumption per week amounts to 27.65 kg/week.

Invasion of Typha is considered a problem by 96.75% of the people surveyed, of which 45.83% of women consider it as important and 53.50% of men also consider it important. However, 21.39% of the people surveyed do not consider the invasion of Typha a major problem, these respondents reside in Auyo, Gatafa, and Yamidi communities.

Main problems caused by Typha invasion, reveal gender differences. That is, women identify problems related to health and safety such as "increases mosquito and incidence of malaria" and "hides poisonous reptiles"; while men refer to problems related to the economic activity such as "decrease crop yield". In addition, both sexes agree on the major problem being "blocks waterways" and consequent flood risk.

BIOENERGY ADOPTION

Despite knowing the great benefits that biogas provides, if people do not want to use it, it does not matter the potential or the number of people who can benefit. It is essential to consider the characteristics of the people and the context to know the true potential of the project that depends to a great extent on the acceptance by the beneficiaries. So, what are the characteristics of the people who determine the adoption of the project?

The main reasons why people said they would consider using biogas for cooking in order of importance would be:

Table 1. Reasons to consider using biogas for cooking

Rank Importance	WOMEN	MEN
1	Avoid smoke related health issues	Saving money
2	Saving money	Avoid smoke related health issues
3	Avoid time and effort collecting firewood	Avoid time and effort collecting firewood
4	Clean and quick biogas cooking	Clean and quick biogas cooking

The two reasons they consider most important are different according to gender for women, it is more important to avoid smoke-related health issues and for men, the most important is saving money.

The main concern about the adoption of biogas is the costs of installing and maintaining the technology. At the second level of importance, opinion differs between men and women. Females are more concerned with the time and effort to feed de biogas, while men mention "Different ways of cooking as compared to firewood". In the last place appears the time and effort to collect the Typha which is positive for the implementation since it is the main source to produce biogas and obtaining it is not considered a problem. We resorted to a T-student test with Rstudio program to find out if the observed difference amid the means between men and women is significant in the willingness to use biogas in their homes. The data sample is assumed to have a normal distribution by the law of large numbers. On the other hand, since data do not meet the assumption of homoscedasticity, the Welch Test is used. Test results are reported in Table 2. Despite women receive a larger part of benefits, we find that men are more willing to adopt biogas than women with differences being significant at 95%, with a p-value well below 0.01. These results are consistent with that found by Getachew Mengistu, Simane, Eshete, & Workneh (2016), Kabyanga, and others, (2018) where they identify that households headed by men are more likely to adopt the technology than those headed by women. This is because women and men have unequal access to land and livestock.

Table 2. Comparison of means between men and women of the disposition of biogas use at home

Welch Two Sample t-test

data: Willingness to adopt biogas by gender
t = -7.0367, df = 258.5, p-value = 1.764e-11
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.7122028 -0.4007484
sample estimates:
mean in group female mean in group male
1.233333 1.789809

CONCLUSIONS

Socioeconomic and demographic variables are expected to be key factors in the adoption of biogas. In general, we find that the set of surveyed communities have very similar socioeconomic characteristics. The main differences are found between men and women. Men are generally the heads of the household and carry out activities that provide income to households, while women carry out activities within the household. Women do not usually have access to formal education, or to own land or animals other than goats and sheep.

We also find that the reasons for willingness to use biogas differ between men and women. For men, the economic aspect is more important, while for women, the interest is to improve the health of household members.

Respondents state that the Typha invasion does have negative impacts. Cleaning of the Typha is necessary, even a couple of times a year to avoid the damage into the water channels. Because of this, people do not consider it an extra burden the need to collect Typha to produce biogas because they already do it, it would only be to give it a use.

It will be necessary to create strategies that help facilitate the adoption of the project to generate the greatest possible benefit. In particular, actions that sensitize community members and facilitate the participation of women who are the main ones affected by firewood smoke. In addition, it will be necessary to encourage and train young people in the new technology so that knowledge can be shared with other members of the community.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank the TYPHA Project [*Developing economic uses of Typha, is an action research component of TRIMING (Transforming Irrigation Management in Nigeria), funded by the World Bank, 2017-2020. IP: Eva Iglesias*] for providing the necessary information to carry out this work, especially Professor Eva Iglesias.

BIBLIOGRAPHY

- Iglesias E, M. L. Loureiro and F. Escibano. Household perceptions on biogas as a sustainable energy source. A focus group study in Hadejia Valley, Nigeria. Conference Workshop September 2-5 Madrid 2018, Spain. Spanish Portuguese Association of Natural and Environmental Resource
- NAERLS, A. Z., 2019. Report of the Socioeconomic survey on the use of Typha grass for biogas production in Hadejia Valley Irrigation Scheme (HVIS) Jigawa State.
- Getachew Mengistu, M., Simane, B., Eshete, G., & Workneh, T. S. (2016). Factors affecting households' decisions in biogas technology adoption, the case of Ofla and Mecha Districts, northern Ethiopia. *Renewable Energy*, 215-227.
- Kabyanga, M., Balana, B. B., Mugisha, J., Walekhwa, P. N., Smith, J., & Glenk, K. (2018). Are smallholder farmers willing to pay for a flexible balloon biogas digester? Evidence from a case study in Uganda. *Energy for Sustainable Development*, 123-129.
- Nguru Wetland System Nigeria. *Environment and Natural Resources Journal*, 44-59.
- TYPHA Project, 2017-2020. *Developing economic uses of Typha. Trimming Action*, World Bank. IP: Eva Iglesias <http://typhaproject.com/>.

INFLUENCIA DEL OZONO EN EL CULTIVO DEL TRIGO

Jiménez Montenegro, Lucía

Tutoras: Giménez Caminero, María Estela; Benavente Barzana, Elena.

Dept. de Biotecnología y Biología Vegetal. ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTORA): lucia.jmontenegro@alumnos.upm.es

RESUMEN

El trigo blando o panadero (*Triticum aestivum* L.) constituye la base de la alimentación para gran parte de la humanidad. El cultivo de trigo a elevados niveles de ozono (O_3) troposférico provoca importantes pérdidas en el rendimiento y la calidad del grano. Con el fin de analizar las bases moleculares que regulan la tolerancia a O_3 , se ha llevado a cabo un ensayo experimental sometiendo un grupo de variedades de trigo a distintas concentraciones de O_3 . Dicho ensayo permitió identificar variedades con diferente nivel de tolerancia. Tras seleccionar variedades muy tolerantes y sensibles a O_3 , se van a realizar análisis de expresión de genes implicados en vías metabólicas y fisiológicas que se ven alteradas en presencia de altas concentraciones de O_3 . Estos estudios permitirán dilucidar qué genes están implicados en la tolerancia a O_3 , un conocimiento esencial para poder seleccionar y desarrollar variedades de trigo mejoradas que sean tolerantes a O_3 .

Palabras clave: *Triticum aestivum* L., ozono (O_3), tolerancia.

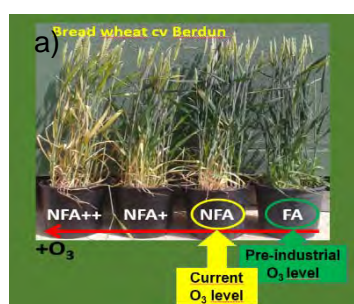
INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica constituye un importante problema ambiental, y es uno de los factores que provocan y aceleran el cambio climático. El O_3 troposférico es un contaminante secundario del aire y un gas de efecto invernadero, cuya concentración ha ido aumentando desde la era industrial y se espera que continúe aumentando en el futuro (Field et al., 2014). El incremento del O_3 troposférico afecta principalmente a los agroecosistemas del hemisferio norte (Mills et al., 2011). Las concentraciones más elevadas de Europa se registran en zonas de la cuenca mediterránea debido a sus características condiciones climáticas: elevada temperatura y radiación solar (Doblas-Miranda et al., 2017). El O_3 troposférico puede proceder tanto del transporte desde la estratosfera como de las reacciones fotoquímicas que se producen entre los contaminantes primarios en presencia de la radiación solar. Nos referimos con contaminantes primarios a aquellos que se emiten directamente a la atmósfera por el tráfico, la industria y la vegetación, que son principalmente óxidos de nitrógeno e hidrocarburos volátiles como el monóxido de carbono (Bermejo et al., 2009).

Una vez formadas, las moléculas de O_3 pueden ser inhaladas por humanos y animales, provocando importantes problemas respiratorios; y también pueden difundir a través de los estomas de las hojas de las plantas desencadenando importantes daños fitotóxicos (Sandermann et al., 1998). Dentro de la hoja, el O_3 difunde y genera numerosas especies reactivas de oxígeno (ROS) que reaccionan con los componentes de la pared celular y la membrana plasmática provocando peroxidación lipídica, plasmólisis (colapso de los protoplastos debido a la ruptura del tonoplasto) y, en muchos casos, muerte celular (Pell et al., 1997). Estos daños a nivel celular alteran numerosos procesos fisiológicos de la planta, entre los que podemos destacar la disminución de la eficiencia fotosintética y de la asimilación de carbono, la senescencia foliar acelerada, la baja eficiencia de asimilación de nitrógeno, fósforo y potasio (Broberg et al., 2017). Esto provoca un debilitamiento de la planta (Figura 1a), reduciendo su capacidad para enfrentarse a otros estreses abióticos y bióticos, lo que conlleva finalmente una reducción en el rendimiento y en la calidad de los cultivos (Mills et al., 2017), que supone un riesgo para la seguridad alimentaria mundial. Entre los cultivos mayoritarios (maíz, trigo, arroz y soja), el trigo blando destaca por ser una de las principales fuentes de energía alimenticia y la principal fuente de proteína de

consumo humano. Es el cereal que mayor concentración de proteína tiene en el grano y, junto con el arroz, la carne y la caña de azúcar, constituyen más del 50% del consumo total de energía (Abbate et al., 2017). Sin embargo, el trigo es uno de los cultivos más sensibles al O_3 en todas sus fases de crecimiento (Singh y Agrawal, 2010), estimándose que las elevadas concentraciones de O_3 son causantes de unas pérdidas de rendimiento del grano entorno al 7-12%; y se espera que esta cifra alcance el 18% en 2030 (Avnery et al., 2011 a y b). Esto confronta con el reto de producir un 60% más de alimento para 2050 (Shiferaw et al., 2013), fundamentalmente en los países desarrollados donde el aumento de la población y de la contaminación es cada vez mayor. Por estas razones se hace necesario comprender las bases moleculares que determinan la tolerancia a O_3 por parte de determinadas variedades de trigo. En este trabajo se han llevado a cabo ensayos de trigo con distintos niveles de O_3 para seleccionar variedades tanto tolerantes como sensibles a O_3 , con el fin último de averiguar qué regulación genética confiere tolerancia al O_3 en determinadas variedades de trigo.

Figura 1: Ensayos de campo.



a) Plantas de la variedad de trigo sensible a O_3 , Berdun, tratadas con distintas concentraciones de O_3 : aire filtrado (FA), que reproduce los niveles de O_3 pre-industriales; aire no filtrado (NFA), que representa los niveles actuales; y aire no filtrado más 20 y 40 ppb de O_3 sobre el nivel ambiental (NFA+, NFA++). Se puede observar cómo se acelera la senescencia conforme aumenta la concentración de O_3 . b) Instalación experimental de cámaras descubiertas en la

finca de Experimentación Agraria del CSIC en Santa Olalla (Toledo).

DISEÑO EXPERIMENTAL

La elevada sensibilidad al O_3 por parte del trigo lo convierte en una especie modelo para realizar estudios sobre cómo el O_3 afecta a la producción agrícola europea. Dentro del marco de este trabajo se ha realizado un estudio con el fin de evaluar la sensibilidad relativa al O_3 de 12 variedades de trigo panificable entre las que se encuentran representadas tanto variedades locales como variedades mejoradas. Este análisis se realizó, en colaboración con el Grupo de Ecotoxicología de la Contaminación Atmosférica del CIEMAT, en la Instalación Experimental de Cámaras Descubiertas (Open Top Chambers, OTCs; Figura 1b) de la Finca de Experimentación Agraria “La Higuera” del CSIC (Santa Olalla, Toledo). Se trata de una instalación específicamente diseñada para el estudio de los efectos de los contaminantes atmosféricos en vegetación en condiciones cercanas a las de campo (semi-naturales). Actualmente es el sistema experimental validado y empleado por el Convenio sobre la contaminación atmosférica transfronteriza de Naciones Unidas para la determinación de efectos por O_3 en vegetación (Mills et al., 2017). La instalación de OTCs del CSIC es la única en funcionamiento en la península. Consta de 12 invernaderos circulares (OTCs) de 3 m de altura x 3 m de diámetro. Cada OTC dispone de un sistema de generación y control de O_3 y medidores que registran de forma continua los niveles de contaminantes atmosféricos (O_3 , SO_2 y NO_x) y las condiciones de crecimiento (temperatura, humedad de suelo y aire, radiación PAR). Para llevar a cabo este estudio se trabajó con 4 niveles distintos de O_3 (desde valores pre-industriales, que se generan mediante filtros de carbono activo, hasta los valores más elevados que se llegan a registrar en la actualidad en España) replicados 3 veces: 3 OTCs (invernaderos) por tratamiento de O_3 , ocupando las 12 OTCs de la instalación. La instalación contiene también 3 parcelas sin OTC para el control del efecto invernadero.

SELECCIÓN DE VARIEDADES

En el ensayo previamente descrito, se analizó cómo el O₃ afecta a la producción y rendimiento en las variedades de trigo en estudio (locales y mejoradas). Para ello, se evaluaron distintas variables fisiológicas (fotosíntesis, intercambio gaseoso), parámetros bioquímicos (metabolitos, pigmentos y actividades enzimáticas), y parámetros de rendimiento y calidad. A partir de los valores observados para los parámetros rendimiento del grano, peso de 100 semillas, índice de cosecha, actividad fotosintética, contenido en clorofilas y contenido relativo de agua (RWC), se pudo determinar la respuesta a O₃ de las distintas variedades, que se clasificaron en distintas categorías según su sensibilidad/tolerancia al O₃ (Tabla 1).

Tabla 1: Rango de sensibilidad de las 12 variedades analizadas.

Variedad	Año de registro	Tipo de variedad	Rendimiento de grano	Peso 100 semillas	Índice de cosecha	Actividad fotosintética	Contenido de clorofilas	RWC
Nogal	2006	Mejorada (Clorimena)	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Sensible	Tolerante	Sensible
Arthur Nick	2002	Mejorada (LG)	Sensible	Sensible	Poco sensible	Sensible	Muy sensible	Sensible
Berdún	1998	Mejorada (LG)	Muy sensible	Muy sensible	Sensible	Sensible	Muy sensible	Sensible
Califa sur	1999	Mejorada (LG)	Muy sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Muy sensible	Muy sensible
Pane-247	1955	Mejorada (Agrusa)	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante
Marius	1980	Mejorada (Benoist)	Muy sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Tolerante	Tolerante
Yecora	1972	Mejorada (CIMMYT)	Tolerante	Sensible	Tolerante	Muy sensible	Muy sensible	Sensible
Ablaca	1982	Mejorada	Sensible	Sensible	Tolerante	Muy sensible	Muy sensible	Muy sensible
Aragón-03	<1940	Variedad local	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Poco sensible
Chamorro	<1940	Variedad local	Tolerante	Sensible	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante
Mocho rojo	(no hay datos)	Variedad local	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante
Candéal de Vellisca	(no hay datos)	Variedad local	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Tolerante	Poco sensible

Con la información obtenida de este estudio, se seleccionaron 3 variedades que mostraron elevada tolerancia a O₃ (Nogal, Chamorro y Aragón-03) y 3 que presentaron mayor sensibilidad (Berdún, Califa Sur y Marius), para llevar a cabo los estudios a nivel genético.

SELECCIÓN DE GENES PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

La bibliografía describe la alteración de varios procesos fisiológicos y metabólicos claves en plantas con la exposición a elevados niveles de O₃, entre ellos, la fotosíntesis, la senescencia, la fijación del nitrógeno, la síntesis de productos antioxidantes, entre otros. Por ello, se escogieron 9 genes candidatos implicados en dichos procesos: 1) los genes que codifican las subunidades grande y pequeña de la Rubisco (rbcS), enzima clave del proceso de fotosíntesis; 2) el gen que codifica la enzima PAL, que cataliza la eliminación de un amonio convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico y que se activa ante el ataque de patógenos; 3) los genes que codifican las glutamina sintetasas 1 y 2 (GS1 y GS2), encargadas de la fijación de Nitrógeno; 4) el gen de la nitrato reductasa (NR), enzima implicada en la síntesis de NO; 5) el gen ACS2, que codifica una enzima clave en la biosíntesis de etileno; y 6) los genes codificantes de las enzimas superóxidodismutasa (SOD) y catalasa (CAT), ambas implicadas en vías antioxidantes.

Como paso previo a la realización de los estudios de expresión, se hizo una revisión bibliográfica para comprobar si la expresión de los genes seleccionados había sido previamente analizada en trigo, con el fin de utilizar los cebadores ya empleados por otros autores (Tabla 2). Posteriormente, se procedió a comprobar *in silico* el correcto anillamiento de los cebadores seleccionados con los genes a evaluar. Para ello se usó la herramienta BLAST de la página web *PlantEnsembl* determinando la especie *Triticum aestivum* (trigo) como especie a comparar. La mayoría de las parejas de cebadores estudiadas anillaban correctamente con el gen motivo de análisis. Sin embargo, dos parejas de cebadores (las diseñadas para los genes ACS2 y la subunidad grande de rubisco) anillaban en dos genes no anotados en el genoma de trigo disponible (coding protein). Para comprobar que estos genes eran los loci que se querían estudiar, se procedió a realizar un Blast, pero esta vez de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), donde están depositados genomas y secuencias genómicas de numerosas especies tanto animales como vegetales. Estos análisis

determinaron que todos los cebadores seleccionados desde la bibliografía servirán para realizar los estudios de expresión de los genes seleccionados en este trabajo.

Tabla 2: Oligonucleótidos seleccionados desde la bibliografía

Gen	Oligo Forward	Oligo Reverse	Artículo de procedencia
TaNR	5'-CCGACAACACTACTACCACT-3'	5'-GCATAGCATCCAACCTCT-3'	(Li et al., 2018)
TaCAT (X94352.1)	5'-AGTTGGACGGATGGTACTGA-3'	5'-AAGACGGTGCCTTTGGGT-3'	(Li et al., 2013)
TaSOD (U69536.1)	5'-TTGTAGGTCGCTGGTTTC-3'	5'-CCAAGTTCACGGTTCATAG-3'	(Li et al., 2013)
PAL	5'-TATTGGCAAGCTGATGTTTCG-3'	5'-GCGCTCTGGACATGGTTAGT-3'	(Pazarlar et al., 2017)
rbcL (Subunidad Large)	5'-ACACCCAGAGTATGAAA-3'	5'-GTCCATCAGTCCAAACAG-3'	(Song et al., 2017)
rbcS (Subunidad Small)	5'-CGGAAGGATCAGGTGC-3'	5'-CCAACCTTGCTGAACTC-3'	(Song et al., 2017)
TaACS2 (U42336)	5'-AGCACCAGCAGCAGAAGG-3'	5'-GTGGACGAGCGGAGACTG-3'	(Yamauchi et al., 2014)
TaGS1 (DQ124209)	5'-AAGGACGGCGGGTCAA-3'	5'-GCGATGTGCTCCTTGCTT-3'	(Yousfi et al., 2016)
TaGS2 (DQ124212)	5'-GCCCTCGCTGCCAAGAA-3'	5'-TCGGCCTTTTCAGGTCTT-3'	(Yousfi et al., 2016)

METODOLOGÍA PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para llevar a cabo esta caracterización se utilizarán muestras de hoja bandera recogidas en antesis de las 6 variedades de trigo seleccionadas, y se procederá a su homogeneización en mortero con nitrógeno líquido. A continuación, se procederá a la extracción del RNA total utilizando el reactivo Tri Reagent y siguiendo el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich). Posteriormente, los RNAs serán tratados con DNasa (Thermo-Scientific) para proceder a la eliminación del DNA genómico contaminante, y se sintetizará cDNA con la retrotranscriptasa reversa de Biotools. Finalmente se llevarán a cabo los análisis de expresión de los genes seleccionados mediante PCR cuantitativa en un equipo LC96 de Roche. Para realizar los análisis de expresión de los genes seleccionados se utilizarán los cebadores específicos mostrados en la Tabla 2. Los datos obtenidos de la q-PCR se procesarán mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, y se realizarán estudios estadísticos para determinar las diferencias de expresión de los genes de interés entre las variedades.

CONCLUSIONES

Con los resultados de estos estudios se pretende asociar la tolerancia a O₃ de determinadas variedades con cambios en la expresión de los genes analizados, permitiéndonos conocer las causas moleculares que conllevan a la tolerancia a O₃ de unas variedades de trigo concretas. Este conocimiento hará posible abordar estudios de mejora para incluir el carácter de tolerancia a O₃ en variedades comerciales previamente mejoradas, con el fin de evitar las pérdidas de rendimiento y calidad que conllevan las exposiciones a altas concentraciones de O₃.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbate P., Cardos M., Campaña L. 2017. Manual de cultivo de trigo. International Plant Institute 1:7-19.
- Avnery S., Mauzerall D.L., Liu J., Horowitz L.W. 2011a. Atmos. Environ. 45: 2284–2296.
- Avnery S., Mauzerall D.L., Liu J., Horowitz L.W. 2011b. Atmos. Environ. 45: 2297–2309.
- Bermejo V., Alonso R., Cozar E.S., Rábago I., García M. 2009. El ozono troposférico y sus efectos en la vegetación. MITECO.
- Broberg M.C., Uddling J., Mills G., Pleijel H. 2017. Sci. Total Environ. 607-608: 876-880.
- Doblas-Miranda E., Alonso R., Arnan X., Bermejo V. et al. 2017. Global and Planetary Change 148: 42-54.
- Field C.B., Barros V.R., Dokken D.J., Mach K.J. et al. 2014. Climate Change. pp 1132.
- Li C., Song Y., Guo L., Gu X. et al. 2018. Environ. Pollut. 236: 296-303.
- Li C-H., Wang T-Z., Li Y., Zheng Y-H., Jiang G-M. 2013. PLoS One. 8(3): e60109.
- Mills G., Hayes F., Sympson D., Emberson L. et al. 2011. Global Change Biology. 17: 592-613.
- Mills G., Harmens H., Hayes F., Pleijel H., González I. 2017. Manual on Methodologies and Criteria for Modelling and Mapping Critical Loads and Levels and Air Pollution Effects, Risks and Trends. CLRTAP 3:4-65.
- Pazarlar S., Cetinkaya N., Bor M., Ozdemir F. 2017. Funct. Plant Biol. 44(10): 1016-1028.
- Pell E.J., Schlaghaufer C.D., Arteca R.N. 1997. Physiol. Plant. 100: 264-273.
- Sandermann H., Ernst D., Heller W., Langebartels C. 1998. Trends Plant Sci. 3: 47–50.
- Shiferaw B., Smale M., Braun H., Duveiller E. et al. 2013. Food Sec. 5: 291–317.
- Singh S., Agrawal S.B. 2010. Agric. Ecosyst. Environ. 138: 214–221.
- Song Q., Su R., Chai Y., Goudia B.D. et al. 2017. J. Plant Physiol. 216: 202-211.
- Yamauchi T., Watanabe K., Fukazawa A., Mori H. et al. 2014. J. Exp. Bot. 65(1): 261–273.
- Yousfi S., Márquez A.J., Betti M., Araus J.L., Serret M.D. 2016. J. Integr. Plant Biol. 58 (1): 48-66.

EL MÉTODO DE TERMINACIÓN DE LOS CULTIVOS CUBIERTA Y LA DISPONIBILIDAD DE AGUA AFECTAN A LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO

Centurión Giménez, Nelly Soledad; Ulcuango, Kelly

Tutores: Hontoria, Chiquinquirá; Mariscal-Sancho, Ignacio

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTORAS): nellysoledad.centurion.gimenez@alumnos.upm.es

RESUMEN

El método de terminación de los cultivos cubierta (CC) es una práctica agrícola que puede afectar a los beneficios que los CC aportan al suelo. A fin de medir los efectos del método de terminación de los CC en diferentes grupos de microorganismos del suelo, se estableció un diseño experimental en microcosmos. El ensayo constó de dos factores de estudio, el método de terminación del CC con cinco niveles: 1. Control sin cultivo cubierta, 2. Desbrozado e Incorporación, 3. Glifosato, 4. *Roller Crimper*, 5. Glifosato+ *Roller Crimper*; y la disponibilidad de agua, con dos niveles de riego: alto y bajo. En total, se obtuvieron 10 tratamientos diferentes, que se distribuyeron en cinco bloques. En todos los tratamientos se utilizó como CC una mezcla de *Hordeum vulgare* L. y *Vicia sativa* L., y como cultivo principal subsiguiente *Zea mays* L. Se realizaron dos muestreos del suelo, el primero en pre-emergencia del maíz, 14 días después de la aplicación del glifosato, donde se determinó la longitud de micelio extrarradical y la abundancia de hongos y bacterias totales. El segundo muestreo se realizó a los dos meses de la terminación de los CC y, además de los parámetros anteriores, se midió la colonización micorrízica en las raíces del maíz. Los efectos de los métodos de terminación en los parámetros microbiológicos del suelo variaron con la dosis de riego y además se vieron modificados por el tiempo transcurrido. En especial, el efecto del glifosato cambió con el transcurso de tiempo y la dosis de agua. Así, en pre-emergencia, el uso de glifosato mostró un efecto negativo sobre la abundancia de bacterias totales, pero este efecto desapareció a los dos meses. En cambio, en este tiempo, se encontró menor abundancia de hongos en glifosato y glifosato+roller crimper en dosis alta de riego. En general, la incorporación de los residuos de CC favoreció la abundancia de hongos y bacterias tanto en alta como en baja disponibilidad de agua. Por su parte, roller grimper tendió a favorecer la abundancia de hongos en detrimento de las bacterias, con efectos positivos en la colonización en dosis alta de agua. Debido al escaso número de estudios sobre el efecto de los métodos de terminación sobre los microorganismos del suelo, es importante continuar con investigaciones que nos ayuden a aclarar los procesos involucrados.

Palabras clave: *glifosato, roller crimper, biología del suelo.*

INTRODUCCION

La adopción de cultivos cubierta (CC) en sustitución del barbecho es una técnica de manejo que brinda importantes servicios ecosistémicos (Schipanski et al., 2014) al reducir la erosión, fijar el nitrógeno atmosférico, reducir la lixiviación de nitrógeno y mejorar la salud del suelo (Quemada y Kaye, 2017). Los CC también favorecen el aumento y el mantenimiento de la biodiversidad microbiana en el suelo (Ruffo y Parsons, 2004). Los procesos microbianos son fundamentales en la descomposición de la materia orgánica y el reciclado de nutrientes, siendo claves en algunos ciclos de nutrientes como el del N (Schimel, 2004). Los beneficios que los CC brindan a los microorganismos pueden ser modificados por las técnicas de manejo, entre estas, el método de terminación. Así, se ha encontrado que el método de terminación puede modificar las propiedades fisicoquímicas del suelo y producir cambios en la composición y abundancia bacteriana del suelo con posibles consecuencias en el ciclo de nutrientes (Romdhane et al., 2019). Sin embargo, la información sobre cómo afectan los CC y su manejo a los microorganismos del suelo

es todavía escasa. Por eso, este estudio pretende evaluar la influencia del método de terminación de los CC sobre los microorganismos del suelo y cómo la disponibilidad de agua puede modular esta influencia. Partimos de la hipótesis de que la incorporación de los residuos favorece la abundancia de bacterias, que el *roller crimper* favorecería la de los hongos y que el glifosato puede afectar de manera negativa a ambos tipos de microorganismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo constó de dos factores de estudio, el primero fue el método de terminación del CC con cinco niveles: 1. Control sin cultivo cubierta (CON), 2. Desbrozado e Incorporación (INC), 3. Glifosato (GLI), 4. *Roller Crimper* (ROL), 5. Glifosato+ *Roller Crimper* (GLI+ROL). El segundo factor fue la disponibilidad de agua, con dos niveles de riego: alto (A) y bajo (B). En total, 10 tratamientos (5x2), que se distribuyeron al azar en cinco bloques o repeticiones. Los 50 microcosmos (9 cm ancho x 30 cm de largo x 12 cm profundidad) se establecieron en un invernadero de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. bajo condiciones semicontroladas. El suelo utilizado se extrajo del horizonte superficial de un Calcisol háplico situado en la vega del Tajo en Aranjuez, Madrid, con un pH básico (8.8), textura franco limosa y materia orgánica baja (1,11%).

El CC utilizado fue una combinación de gramínea y leguminosa (*Hordeum vulgare* L.+ *Vicia sativa* L.), que se sembró el 10/12/18. El CC se regó según el nivel de riego correspondiente, siendo el nivel bajo un 75% del alto. Transcurridos 102 días, se aplicó el glifosato (en GLI y GLI+ROL) según dosis comercial (4 L /ha) y una semana después se terminó el CC según el resto de los métodos. A continuación, se sembró el maíz (*Zea mays* L.) con una densidad de 3 semillas por maceta. Se aplicó la dosis de riego correspondiente y todos los tratamientos recibieron la misma fertilización. (N, P₂O₅, K₂O 37- 35- 60 por kg/ha)

Se realizaron dos muestreos del suelo, el primero a los 14 días después de la aplicación del glifosato, en pre-emergencia del maíz, donde se determinó la longitud de micelio extrarradical (Jakobsen et al., 1992; García-González et al., 2016). La estimación de hongos y bacterias totales se realizó por Q-PCR (LightCycler® 480 Roche), utilizando primers universales (16S y ITS). Los pares de primers, utilizados para hongos y bacterias fueron: ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC; ITS5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (Schoch et al. 2012) y 341-TCCTCCGTCTATTGATATGC; 541-ATTCCGCGGCTGGCA (Lopez-Gutierrez et al.,2004) respectivamente. El muestreo final se realizó 57 días tras la siembra del cultivo principal, y se analizaron las mismas determinaciones que en el primer muestreo, así como el porcentaje de colonización micorrícica en las raíces del maíz según Vierheilig et al, (1998) y McGonigle et al. (1990). En ambos muestreos, se calculó la relación hongo/bacteria. Los datos fueron analizados con el software estadístico Statgraphics, Centurión XVIII. Se aplicó un análisis de varianza con un modelo lineal general para un diseño en bloques con dos factores, asegurando la linealidad y homocedasticidad de los datos. Las diferencias entre las medias se evaluaron usando la prueba de rangos múltiples del Test de Tukey para p-valor < 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de los métodos de terminación en los parámetros microbiológicos variaron con la dosis de riego y, considerando esa interacción, fueron analizados por separado según dosis alta y dosis baja de riego. La longitud de micelio extrarradical en el primer muestreo (Tabla 1a) sugiere valores ligeramente mayores con la dosis alta de riego, donde no revela diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, en la dosis baja, el tratamiento INC incrementó significativamente la longitud de micelio con respecto al tratamiento control. Los menores valores mostrados por CON confirman que la utilización de los CC representa una buena práctica agrícola que puede promover el micelio y con ello mitigar el efecto negativo del déficit de agua (Valle et al., 2009). La abundancia de hongos se vio incrementada con el tratamiento GLI+ROL en los dos niveles de riego

($p < 0,05$). Nuestros resultados sugieren que la terminación con glifosato se realizó días antes y que el uso posterior del roller crimper, que tumba y forma una cobertura en superficie, favorece la descomposición por parte de los hongos. La abundancia de bacterias se vio afectada negativamente por el uso de GLI como método de terminación, tanto en dosis alta como en dosis baja. Estos resultados se contraponen a los encontrados por Sheng et al. (2012), quienes observaron que el glifosato afectó a la microbiota del suelo estimulando el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, en nuestro estudio, este efecto positivo sobre las bacterias se observó en la dosis alta de riego cuando se empleó el método de terminación INC.

Tabla 1. Parámetros microbiológicos evaluados en a) pre-emergencia y b) a los 57 días de la siembra según método de terminación y nivel de riego.

a) Pre-emergencia

Método de Terminación	Dosis de riego	Longitud de Micelio (cm/g)	Hongos totales (número de copias x g de suelo)	Bacterias totales (número de copias x g de suelo)
Control	A	5.57±1.40 a	2.58E+06 ± 317364 d	8.06E+08 ±1.64E+08 c
Incorporado	A	7.62 ±1.14 a	9.49E+06 ± 627758 b	4.26E+09 ±7.78E+08 a
Glifosato	A	7.32±1.65 a	9.49E+06 ± 990697 b	6.31E+07 ±1.35E+07 d
Roller	A	6.83±2.23 a	6.04E+06 ± 1.70E+06 c	1.73E+09 ± 1.87E+08 b
Gli + Rol	A	5.22 ± 1.74 a	2.81E+07± 4.81E+06 a	8.93E+08 ±1.12E+08 c
Control	B	2.81±0.88 b	1.67E+06 ± 83666 d	2.11E+08±4.63E+07 c
Incorporado	B	5.75±1.8 a	1.48E+07 ± 2.75E+06 b	1.34E+09 ±1.82E+08 a
Glifosato	B	4.61±1.19ab	1.32E+07 ± 1.72E+06 b	8.39E+08 ±1.51E+08 b
Roller	B	4.54±0.73 ab	9.12E+06 ± 1.48E+06 c	1.64E+09 ± 2.10E+08 a
Gli + Rol	B	4.62± 0.38 ab	4.33E+07 ± 5.20E+06 a	1.58E+09 ±2.04E+08 a

b) 57 días después de la siembra

Método de Terminación	Dosis de riego	Longitud de Micelio (cm/g)	Colonización	Hongos totales (número de copias x g de suelo)	Bacterias totales (número de copias x g de suelo)
Control	A	4.72±2.56 a	5.0±2.44 b	1.98E+06 ± 258612 c	7.29E+09 ±1.40E+09 c
Incorporado	A	8.29±2.34 a	14.0±5.0 a	1.43E+07 ± 1.68E+06 a	3.90E+10 ± 7.02E+09 a
Glifosato	A	5.53±2.23 a	10.25±4.71 ab	3.77E+06 ± 654355 b	2.40E+10 ± 8.78E+09 b
Roller	A	6.39±2.80 a	14.8±5.26 a	1.23E+07 ± 2.61E+06 a	1.07E+10 ± 1.86E+09 c
Gli + Rol	A	4.39±1.94 a	8.25±1.70 ab	4.38E+06 ± 2.47E+06 b	3.16E+10 ± 1.11E+10ab
Control	B	4.34±1.12 a	5.8±1.6 b	2.29E+06 ± 523803 c	7.81E+09 ± 6.80E+08 b
Incorporado	B	6.96±3.25 a	12.6±4.39 a	1.42E+07 ± 2.95E+06 a	1.80E+10 ± 4.27E+09 a
Glifosato	B	4.21±0.53 a	5.0±1.22 b	1.30E+07 ± 1.79E+06 a	9.17E+09 ± 1.30E+09 b
Roller	B	5.10±1.45 a	7.6±1.81 ab	1.17E+07 ± 3.59E+06ab	9.15E+09 ± 2.23E+09 b
Gli + Rol	B	4.03±0.95 a	6.6±4.15 b	7.85E+06 ± 801542 b	8.02E+09 ± 1.63E+09 b

A: Dosis alta de riego, B: Dosis baja de riego, Gli +Rol: Glifosato + Roller Crimper. Los valores indican media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada dosis de riego indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos según el test HSD de Tukey al 95%.

El tipo de terminación sobre la relación hongo/bacteria resultó en una relación mayor en los tratamientos con GLI+ROL, seguido de la utilización sola del glifosato. Esto contradice a Sheng et al. (2012), quienes asociaron el uso de glifosato a los aumentos en la capacidad competitiva de las bacterias en relación a los hongos. Más estudios son necesarios para confirmar el impacto del glifosato sobre la microbiología del suelo, ya que sus efectos están sujetos a las condiciones bajo las cuales se aplica, como por ejemplo la dosis empleada (Guyen et al., 2016).

Con el paso del tiempo, se observaron cambios en los efectos de los métodos de terminación sobre los microorganismos. En el muestreo 57 días después de la siembra (Tabla 1b), no se observó efecto del método de matado sobre la longitud de micelio (Savin et al., 2009). La colonización micorrízica se vio favorecida por INC tanto en dosis baja como en alta, y en esta última también por ROL. Además, las bacterias y los hongos totales resultaron en valores más altos en INC, independientemente de la dosis de agua. Respecto a la incorporación de residuos, la entrada de residuos vegetales dentro del suelo y su uso como fuente de C y energía, estimula la abundancia de bacterias e incluso la de hongos. El efecto estimulador parece compensar el posible daño por la alteración del suelo, minimizado en este caso al tratarse de una labor vertical a poca profundidad. El efecto negativo de GLI sobre las bacterias desapareció a los 57 días, sin embargo, se observó que el uso de GLI y ROL disminuyó la abundancia de hongos en dosis alta de riego. En línea con nuestra hipótesis, la relación hongo/bacteria se vio acentuada con el roller crimper.

CONCLUSIONES

Los efectos del método de terminación del CC sobre parámetros microbiológicos del suelo están condicionados por la disponibilidad de agua y estos efectos varían con el paso del tiempo. Transcurridos dos meses de la terminación del CC, la incorporación de los residuos fue el método que más favoreció la abundancia de hongos y bacterias. El roller crimper también potenció la abundancia de hongos. El uso de glifosato mostró un efecto negativo transitorio sobre las bacterias y con el paso del tiempo se observó un efecto negativo sobre los hongos en la dosis alta de riego. Se necesitan más estudios que puedan ayudar a comprender mejor el efecto de los métodos de terminación sobre estos microorganismos del suelo.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación CASAM de la Universidad Politécnica de Madrid, y especialmente a C. Hontoria, I. Mariscal-Sancho, K. Ulcuango y M. Navas. A los proyectos AGL2017-83283-C2-1-R y AGRISOST-CM S2013/ABI-2717, cofinanciado por Programa Operativo FSE y FEDER 2014-2020. Y al programa de Becas de postgrado "Carlos Antonio López" de Paraguay por la financiación de mi programa de doctorado.

BIBLIOGRAFÍA

- García-González I., Quemada M., Gabriel J.L., Alonso-Ayuso M., Hontoria, C. 2018. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 181: 818-826.
- Jakobsen I., Abbott L.K., Robson A.D. 1992. *New. Phytol.* 120: 371-380.
- Kaye, J.P., Quemada, M. 2017. *Agron Sostener. Dev.* 37: 1- 4.
- López-Gutiérrez J.C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G., Philippot L. 2004. *J. Microbiol. Methods* 57:399-407.8
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A. 1990. *New. Phytol.* 115: 495-501.
- N, Guyen., D.B., Rose, M.T., Rose, T.J., Morris S. G., Van, Zwieten L. 2016. *Soil Biology and Biochemistry.* 92: 50-57.
- Romdhane S., Spor A., Busset H., Falchetto L., Martin J., Bizouard F., Bru D., Breuil M.C., Philippot L., Ruffo, M. L., Parsons, A. 2004. *Inf. agr. del cono sur.* 21:13-16.
- Savin, M. C., Purcell, L. C., Daigh, A., Manfredini, A. 2009. *J Plant Nutr.* 32: 1702-1717.
- Sheng, M., Hamel, C., Fernandez, M. R. 2012. *Can J Microbiol.* 58: 990-1001.
- Schimel, J. 2004. *P Natl Acad Sci USA.* 101: 12400-12401.
- Schipanski, M. E., Barbercheck M., Douglas, M.R., Finney, D.M., Haider, K., Kaye, J.P., Kemanian, A.R. 2014. *Agric Syst.* 125: 12-22.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A.. (2012). *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(16), 6241-6246.
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, Urs., Piché, Y. 1998. *Appl. Reinar. Microbiol.* 64: 5004-5007.

¿PUEDEN LOS T6SS (SISTEMAS DE SECRECIÓN) DE RIZOBIOS FACILITAR LA INTERACCIÓN CON LEGUMINOSAS?

De Sousa, Bruna Fernanda¹; Tighilt, Lilia²

Tutor: Rey Navarro, Luis¹

¹Dept. de Biotecnología y Biología Vegetal ETSIAAB y Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid.

²Dept. de Microbiología, Universidad Abderrahmane Mira, Bejaia, Argelia.
Correo electrónico (AUTORAS): bruna.sdesousa@alumnos.upm.es

RESUMEN

En estos momentos somos cada vez más conscientes de que el desarrollo, supervivencia y productividad de las plantas está relacionado con su microbioma. Los rizobios son bacterias simbióticas que forman parte del microbioma de la mayoría de las leguminosas. Son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en estructuras especializadas de la raíz llamadas nódulos. Dos terceras partes de los rizobios secuenciados tienen genes que permiten construir un sistema de secreción o nanojeringa llamado sistema de secreción tipo VI (T6SS) que inyecta proteínas (efectores) al espacio extracelular o a otras células. Los T6SSs se han identificado sólo en bacterias Gram negativas y los efectores descritos participan en toxicidad antibacteriana, virulencia o transporte de metales. En nuestro grupo estamos caracterizando posibles efectores de dos rizobios, uno, Re.482, posible antibacteriano, de *Rhizobium etli* Mim1 que nodula *Phaseolus vulgaris* y otro, BrA16.3894 de *Bradyrhizobium* sp AL16 que nodula *Lupinus angustifolius* y que podría ser relevante en la interacción simbiótica con su leguminosa hospedadora. Hasta ahora no se ha identificado ningún efector que actúe en células de leguminosas.

Palabras clave: simbiosis rizobio-leguminosa, efectores, T6SS

INTRODUCCIÓN

Existe una importante interdependencia entre las plantas y su microbioma (Sánchez-Cañizares et al., 2017). En el caso de las leguminosas, los rizobios juegan un papel esencial por el aporte nitrogenado que realizan. Son numerosos los factores que intervienen en la simbiosis rizobio-leguminosas. Entre ellos se encuentran la secreción de proteínas por los rizobios en el citoplasma vegetal. También es relevante la competencia en la rizosfera. El sistema de secreción tipo VI (T6SS) puede exportar directamente proteínas a otras bacterias y ha demostrado tener un efecto en la competencia rizosférica interbacteriana mediante la producción de efectores tóxicos (Lin et al., 2018). Frecuentemente los genes que los codifican forman parte de una pareja (pareja E-I) con los llamados genes de inmunidad que permiten sintetizar una proteína que contrarresta un efecto negativo del efector en la propia célula o en células hermanas (Russell et al., 2013). Por otra parte se ha señalado que genes de efectores huérfanos, es decir no acompañados por el correspondiente gen de inmunidad, son excelentes candidatos para codificar efectores con destino eucariótico (Trunk et al., 2018). En este trabajo se presentan los avances sobre la caracterización de diferentes cepas rizobianas secuenciadas, *Rhizobium etli* Mim1 (Rogel et al., 2014) y *Bradyrhizobium* sp AL16 (Bourebaba et al., 2016), que nodulan eficientemente *Phaseolus vulgaris* y *Lupinus angustifolius*, respectivamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo de plantas y microorganismos

Las semillas de *P. vulgaris* y *L. angustifolius* se desinfectaron con lejía al 12.5% tras sumergirse un minuto en etanol. Tras lavarse con abundante agua estéril, se dejaron

germinar 3 días a 25 °C en oscuridad. Una vez germinadas, se crecieron en invernadero en macetas de plástico (con solución Leonard (Vincent, 1970)) y en condiciones bacteriológicamente controladas, añadiendo 1 mL de cultivo bacteriano en fase estacionaria y fueron utilizadas dos semillas/maceta.

Los cultivos microbianos de rizobios se incubaron a 28 °C en medio YMB (Yeast Mannitol Broth) y las de *Escherichia coli* en LB (Lysogeny Broth) (Pacheco, 2015).

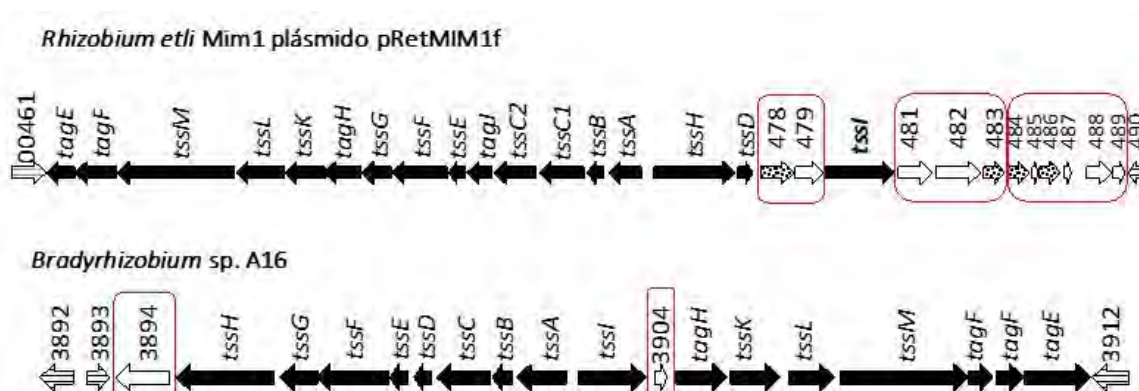
Construcción de mutantes

Se han seguido dos modalidades, a) mediante mutagénesis dirigida, que se realizó la PCR con dos oligos solapantes con cambios en la secuencia para sustituir aminoácidos esenciales en la proteína Re.482 y su clonaje posterior en pK18mobSacB que se conjugó a ReMim1 seleccionando los dobles recombinantes (Schäfer et al., 1994) y b) por amplificación por PCR de un fragmento interno del gen brA16.3894 que se clonó en pK18mobSac (Schäfer et al., 1994) y se conjugó a BrA16 seleccionando los recombinantes simples, (Fig.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La organización de los T6SS de *R. etli* Mim1 (ReMim1) y *Bradyrhizobium* sp. A16 (BrA16), se presentan en la Figura 1. Se han señalado con un recuadro rojo los genes que podrían codificar para efectores, donde los blancos podrían ser los efectores tóxicos y con trama punteada se señalan aquellos que podrían ser proteínas de inmunidad. Y los negros corresponden a proteínas estructurales y reguladoras conservadas en T6SS de otras bacterias.

Figura 1. Organización génica del T6SS de rizobios.



En trabajos previos se han realizado mutantes en genes estructurales de los T6SS de ReMim1 y BrA16 que carecían de un T6SS funcional (Salinero-Lanzarote et al., 2019 y datos no publicados) y se observó que las plantas eran más pequeñas, similares a los controles sin inocular, respecto a las plantas noduladas por las cepas parentales. Por tanto los T6SSs de estas bacterias parecen tener un efecto positivo para la simbiosis. Identificar los efectores responsables de ese efecto positivo es ahora nuestro principal objetivo

La proteína Re.482 tiene homología de secuencia de aminoácidos con DNAsas que forman parte de los efectores-T6SS dependientes descritos en *Agrobacterium tumefaciens* (Ma et al., 2014) y por tanto su función podría ser antibacteriana. En este trabajo se ha obtenido una cepa mutante, Re.482, con dos mutaciones puntuales que afectan a dos aminoácidos considerados clave para la función de las DNAsas de *Agrobacterium* y que en Re.482 corresponden a histidina (H431) y un aspartato (D434), y

que fueron sustituidos por Alaninas. Las judías noduladas por Re.482 mostraron una disminución de un 10% del peso y una reducción del 60% en el número de nódulos, en comparación a la cepa parental (Tabla 1). El tamaño y aspecto de los nódulos inducidos por la cepa parental y los inducidos por la cepa mutante fueron similares.

Tabla 1. Fenotipo simbiótico de rizobios y mutantes en genes de posibles efectores dependientes de T6SS.

Rizobio	Nº nódulos	Peso fresco nódulos (g)	Peso seco parte aérea (g)
<i>Phaseolus vulgaris</i>			
Control	0	0	0,23
ReMim1	29	0,26	0,41
Re.482	13	0,09	0,36
<i>Lupinus angustifolius</i>			
Control	0	0	0,22
BrA16	69	0,46	0,31
BrA16.3894	47	0,42	0,26

Por otro lado se ha truncado el gen que codifica la proteína BrA16.3894 con un dominio de O-metiltransferasas. La cepa mutante BrA16.3894 induce nódulos en plantas de *L. angustifolius* con una disminución de un 20% del peso y una reducción del 30% en el número de nódulos en comparación a la cepa parental (Tabla 1). En este caso los nódulos de la cepa mutante eran mayores que los inducidos por la cepa parental, (Fig. 2). Los resultados obtenidos corresponden a dos plantas independientes de un ensayo y se necesitan más réplicas para ser concluyentes.

Resultados no publicados obtenidos en nuestro grupo muestran que los genes re478-479 no tienen un papel relevante en la simbiosis. Los genes re481-483, son homólogos a genes de *A. tumefaciens* que codifican para una proteína chaperona, un efector con actividad DNAsa y una proteína de inmunidad respectivamente. Los resultados de este trabajo indican que el gen re482, posible DNAsa, tiene una relevancia leve en el peso seco de judías por lo que su función no estaría relacionada con el fenotipo simbiótico sino con competición interbacteriana en la rizosfera. Función esta que forma parte del trabajo que se está haciendo actualmente, conocer la relevancia del tercer grupo de genes re484-489. En estos momentos disponemos de una cepa con los 6 genes deletados y se está evaluando su importancia en simbiosis. Algunas de las proteínas codificadas por estos genes tienen homología con proteínas de inmunidad (Fig.1).

Respecto al T6SS de la cepa BrA16, entre los genes de función desconocida que pudieran codificar efectores, sólo hemos identificado dos genes que son huérfanos (Fig.1). La inoculación de *L. angustifolius* con la cepa mutada BrA16.3894 generó plantas con un 80% del peso de las plantas inoculadas con la cepa parental frente al 71% de las plantas sin inocular (Tabla 1). Además, los nódulos parecen tener un aspecto distinto y se van a observar con más detalle en preparaciones para microscopio.

El fenotipo se observó 5 semanas tras la inoculación. En la parte inferior se presenta un detalle de los nódulos. El control: plantas sin inocular.

Se puede pensar que BrA16.3894 podría actuar en las células vegetales ya que su ausencia produce plantas con fenotipo simbiótico intermedio entre las inoculadas por la cepa parental y las no inoculadas. Esta posibilidad es acorde con la descripción de efectores huérfanos cuya diana de actuación está en células eucariotas (Trunk et al., 2018). Hay que estudiar si la otra proteína huérfana, BrAL16.3904 tiene un papel similar

16 de junio de 2020

para lo cual estamos obteniendo un mutante en el gen correspondiente y un doble mutante BrA16.3904-3894.

Figura 2. Fenotipo simbiótico de *L. angustifolius* inoculado con la cepa mutante Bra16.3894 (Methyl).



CONCLUSIONES

El gen re.482 del T6SS de Re, codifica una proteína homóloga a DNAsas y tiene un papel poco importante en simbiosis con judías por lo que su función principal podría ser como antibacteriano y aportar ventajas adaptativas en la rizosfera.

La mutación en el gen brA16.3894 del T6SS de BrA16 que codifica una proteína homóloga a O-metil transferasas, produce un fenotipo simbiótico intermedio al de la cepa parental y plantas de *L. angustifolius* no inoculadas por lo que podría ser relevante en la interacción simbiótica con su leguminosa hospedadora. El hecho de que brA16.3894 no tenga un gen para proteína de inmunidad adyacente apoya esta hipótesis.

AGRADECIMIENTOS

A Álvaro Salinero y Yasmina Bourebaba por su trabajo previo. Al CNPq por la Beca de doctorado (Ref 204842/2018) de Brasil para BFSdeS, a del gobierno de Argelia para LT y a la financiación del MCINU (Ref RTI2018-094985-B-I00). A JM Palacios y al lab 251 (CBGP) y a F. Boulila (Universidad Abderrahmane Mira, Bejaia), por su apoyo.

BLOGRAFÍA

- Bourebaba, et al. 2016. Systematic and Applied Microbiology, 39.4, 266-274.
Lin, et al. 2018. Molecular Plant-Microbe Interactions, 31.8, 856-867.
Ma et al. 2014. Cell Host & Microbe., 16, 94-104.
Pacheco Moreno, A. 2015. Graduation Thesis, Madrid, UPM.
Rogel et al. 2014. BMC Genomics 15:575.
Russell et al. 2013. Nature, 496 (7446), 508.
Salinero-Lanzarote et al. 2019. FEMS Microbiology Ecology, 1; 95(5), fiz054
Sánchez-Cañizares et al. 2017. Current Opinion in Microbiology. 38, 188-196.
Schäfer et al. 1994." Gene 145 (1), 69-73.
Trunk et al. 2018. Nature microbiology 3(8), 920-931.
Vincent J.M. 1970. IBP Handbook. Blackwell, Oxford, UK

EFFECTIVIDAD CONTRA LA METÁSTASIS CEREBRAL MEDIANTE EL TRIPLE FRENTE INMUNOTERAPIA-QUIMIOTERAPIA-PEDF

Luján Tirado, María

Tutores: Ramírez Castillejo, María del Carmen; Alegría Aravena, Nicolás

Dept. de Biotecnología-Biología Vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTORA): m.lujant@alumnos.upm.es

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) o glioma de tipo 4 es de los tumores más agresivos que afecta al sistema nervioso central, con una elevada tasa de mortalidad. Muchos estudios de la última década apuntan a las células madre tumorales (CMTs) como las causantes de la enfermedad. Al presentar división asimétrica y capacidad de autorrenovación, son capaces de resistir a los tratamientos recibidos y de generar situaciones de recurrencia en muchos pacientes. Se propone emplear el extremo carboxilo terminal del mediador carcinogénico PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor), producido por los endotelios, en conjunción con el fármaco temozolomida, con el fin de disminuir la resistencia al tratamiento quimioterapéutico del tumor. Al mismo tiempo, se pretende estudiar la posible estimulación del sistema inmunitario derivada de la ruta de señalización de PEDF, con el fin de incluir la inmunoterapia como tratamiento complementario. Por ende, el modelo presentado en esta revisión pretende interrelacionar distintos factores del ecosistema tumoral, como son el sistema inmunológico, el endotelio y el propio tumor, con el fin de crear un triple frente inmunoterapia-quimioterapia-PEDF para reducir la capacidad de metástasis de las CMTs de GBM.

Palabras clave: glioblastoma, temozolomida, PEDF.

INTRODUCCIÓN

Situación actual del cáncer

El cáncer es la enfermedad con mayor morbimortalidad a nivel mundial. De acuerdo con los últimos datos recogidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de tumores continúa creciendo, aumentando de los 14 millones de casos en el año 2012 a los 18,1 millones en 2018. Se espera que para el año 2040 se alcancen los 29,5 millones de casos.

Para el cáncer cerebral y del sistema nervioso, según Globocan (2018) (*Global Cancer Observatory*), en el año 2018, para ambos sexos y todas las edades, la incidencia mundial (número de casos nuevos por año expresado en número absoluto) fue de 296.851 casos, la mortalidad fue del 81,2% y la prevalencia en 5 años (número de casos totales en los 5 años anteriores) fue del 0,01% (771.110 casos sobre el total de la población). Este tipo de cáncer es el 17º más frecuente, y el 12º más mortal a nivel global (*Brain, nervous system*, 2018).

En España, según la Agencia Española Contra el Cáncer (AECC), los tumores cerebrales presentan una incidencia de 4.073 casos totales por año en varones y de 2.524 casos totales por año en mujeres. La distribución por sexos muestra un discreto predominio de los tumores benignos en mujeres mientras que los malignos, al igual que las cifras globales, son mayores en varones.

Glioblastoma Multiforme

El Glioblastoma Multiforme (GBM), más conocido como glioma de tipo 4, es el tumor primario más agresivo que afecta al sistema nervioso central (SNC) (Louis et al., 2016),

asociado frecuentemente al envejecimiento. Este es causado por un funcionamiento anormal y un descontrol en la proliferación de los astrocitos, las células más comunes y numerosas del SNC, que generan gliomas que al evolucionar aumentan en agresividad y se transforman en glioblastomas multiformes (Matias et al., 2018). La aparición de estos tumores es por lo general en regiones supratentoriales de los hemisferios cerebrales, mientras que otro porcentaje mucho menor ocurre en la región infratentorial.

La calidad de vida de los pacientes se deteriora a medida que la enfermedad progresa. Los principales factores que intervienen corresponden a depresión, fatiga, alteraciones del sueño y deterioro cognitivo (Nabors et al., 2017).

Tratamiento para GBM

A pesar de la complejidad del tratamiento convencional para estos tumores, comprendiendo cirugía, radioterapia y quimioterapia con el fármaco temozolomida (TMZ), la tasa de supervivencia de los pacientes de GBM es aproximadamente de 15 meses tras el diagnóstico (Stupp et al., 2009). Esto es debido a los mecanismos de resistencia y alta heterogeneidad del tumor, la cual parece la clave indispensable para la progresión, resistencia, metástasis y recurrencia del mismo (Patel et al., 2012).

Los glioblastomas se caracterizan por presentar atipia nuclear, pleomorfismo celular, actividad mitótica, patrón de crecimiento difuso, proliferación microvascular y/o necrosis (Faria et al., 2006). Estas características son resultado de inestabilidad genómica y desregulación de varias vías de señalización molecular que culminan en una elevada resistencia a la quimioterapia (Wirsching et al., 2016). En particular, se demostró que TMZ no afecta significativamente la proliferación de las células glía, microglía y astrocitos (Moura-Neto et al., 2012). Por ello, la búsqueda de nuevos tratamientos ha llegado a la combinación de fármacos con metabolitos secundarios que sean capaces de generar un efecto potenciador del mismo.

Células madre tumorales

Las células madre tumorales (CMTs o Cancer Stem Cells, CSCs), también conocidas como células iniciadoras de tumores (CITs o Tumor Initiating Cells, TICs), llevan años en el punto de mira debido a que muchas teorías apuntan a ellas como iniciadoras de procesos neoplásicos, tanto de los primarios como de las recidivas. Al igual que las células madre no tumorales, CSCs sufren divisiones asimétricas, lo que permite la autorrenovación y generación de una población de células que forman el tumor, al mismo tiempo que se procura el mantenimiento de dichas células. Además, su lenta tasa de división aporta resistencia terapéutica al tumor. De este modo, la población de CSCs permanece, sufriendo una transición epitelial-mesenquimal, invadiendo nichos lejanos y causando la recaída (Seyfried et al., 2013).

Proteína reguladora de la autorrenovación: PEDF

La proteína PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor) ha demostrado poseer efectos en la autorrenovación de las células madre y, en consecuencia, en la progresión de los tumores. Por un lado, induce la diferenciación celular y la apoptosis tumoral, y por otro, inhibe la proliferación tumoral, la vascularización, la migración celular, la invasión y la metástasis. La estimulación que produce en la autorrenovación de las células madre se puede inhibir de forma competitiva por el dominio C-terminal de la proteína, provocando una disminución del número de células madre presentes en el cultivo (Ramírez-Castillejo et al., 2006).

El sistema inmunitario

Con respecto a la inmunidad antitumoral, es necesario destacar que los tumores estimulan respuestas inmunitarias adaptativas específicas, no obstante, estas no impiden

con frecuencia el crecimiento de los tumores. Durante la progresión del glioma, la barrera hematoencefálica permite la entrada de células del sistema inmune desde la sangre, lo cual promueve la neuroinflamación. En cambio, estas alteraciones inducen a su vez la quimiotaxis y activación de células glía que, en consecuencia, contribuyen al crecimiento del tumor (Gieryng et al., 2017). Además, las células tumorales presentan la habilidad de evadir las células del sistema inmune mediante la liberación de factores inmunosupresivos como citoquinas, quimiocinas o factores neurotróficos y morfogénicos, entre otros (Roggendorf et al., 1996). El principal mecanismo de protección inmunitaria frente a los tumores es la muerte de las células tumorales a manos de los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ a través del reconocimiento y presentación de antígenos tumorales por las células presentadoras de antígenos. Los linfocitos CD4+ pueden participar en las respuestas inmunitarias antitumorales proporcionando citocinas para la diferenciación de los linfocitos T CD8+ en CTL efectoras y de memoria. Además, los linfocitos T cooperadores específicos frente a los antígenos tumorales pueden secretar citocinas que favorecen la actividad de las células presentadoras de antígenos, al mismo tiempo que aumentan la actividad lítica de los CTL y activan a los macrófagos para que destruyan las células tumorales (Abbas et al., 2018). En los protocolos de terapia actual ya hay distintos fármacos inhibidores de puntos clave de la activación y respuesta del sistema inmune ante las células neoplásicas, como son los inhibidores de PD1, CTL4A. En este estudio también se trabajará con terapias combinadas de estos inhibidores (inmunoterapia), en conjunción con el estudio del efecto de los derivados de PEDF y su ruta de señalización.

OBJETIVOS

Los objetivos principales de este proyecto son, en primer lugar, estudiar el efecto del extremo C-terminal de la proteína PEDF junto con el fármaco quimioterapéutico TMZ sobre la capacidad de metástasis de CMTs de GBM así como sobre la resistencia al tratamiento quimioterapéutico de dichas células. En segundo lugar, estudiar el papel del sistema inmunológico sobre la capacidad de metástasis de CMTs de cerebro en conjunción con el extremo C-terminal de la proteína PEDF y el fármaco TMZ.

Con estos objetivos se pretende dar validez a nuestra **hipótesis de trabajo**, que es probar la efectividad del triple frente inmunoterapia, quimioterapia con TMZ y la proteína PEDF para reducir la capacidad de metástasis de CMTs de GBM.

LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Para la comprobación de dicha hipótesis será necesario, en un futuro, llevar a cabo ensayos de viabilidad celular y cocultivos de células tumorales y células del sistema inmunitario. Por un lado, con los ensayos de viabilidad celular se obtendrían curvas de dosis-respuesta, que nos permitirían obtener información sobre la supervivencia de las CMTs de GBM ante el fármaco TMZ y ante el extremo C-terminal de PEDF en conjunción con células del sistema inmunitario. Por otro lado, con los cocultivos de células tumorales y células del sistema inmunitario como linfocitos, macrófagos y células dendríticas, se evaluaría el efecto de la inmunidad antitumoral estimulada por células de GBM. De estos ensayos se esperaría, en primer lugar, obtener respuesta a la baja efectividad de los tratamientos actuales contra GBM. En segundo lugar, se esperaría ver una modificación de la resistencia de las CMTs por parte de PEDF, siendo esta proteína más efectiva en conjunción con el fármaco TMZ. Y, en tercer lugar, se esperaría ver una optimización de la respuesta inmunitaria frente a las CMTs de GBM al ser esta estimulada por PEDF.

Las aplicaciones tecnológicas que se podrían esperar siguiendo estas líneas de investigación futuras son, fundamentalmente, una mayor respuesta de las células de Glioblastoma Multiforme a los tratamientos anti-neoplásicos y una mejor invasividad de dichas células tras los tratamientos, tanto con PEDF y sus derivados como con los

activadores inmunológicos. Se podría implementar un doble tratamiento de quimioterapia más inmunoterapia que presente el mismo efecto que ambos tratamientos por separado, disminuyendo la tasa de recaída en metástasis de dichas células, reduciendo así las dosis de medicamento, los efectos secundarios del mismo, los gastos del tratamiento y, en última instancia, mejorando la calidad de vida del paciente.

AGRADECIMIENTOS

A Carmen Ramírez Castillejo, por adentrarme en este mundo lleno de posibilidades, por su guía y su motivación. A Nico, por abrir el paso a mi estudio. A mis compañeros de grupo, Elizabeth, Mafer, Raquel, María y Adrián, por hacerme llegar cada día con una sonrisa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología Celular y Molecular + StudentConsult*. Elsevier. Retrieved from <https://tienda.elsevier.es/inmunologia-celular-y-molecular-9788491132752.html>
- Brain, nervous system*. (2018). Retrieved from <http://gco.iarc.fr/today>
- Faria, J., Romão, L., Martins, S., Alves, T., Mendes, F. A., De Faria, G. P., Hollanda, R., Takiya, C., Chimelli, L., Morandi, V., De Souza, J. M., Abreu, J. G., & Neto, V. M. (2006). Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization. *Differentiation*, *74*(9–10), 562–572. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00090.x
- Giering, A., Pszczolkowska, D., Bocian, K., Dabrowski, M., Rajan, W. D., Kloss, M., Mieczkowski, J., & Kaminska, B. (2017). *Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas OPEN*. doi: 10.1038/s41598-017-17752-w
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 131, Issue 6, pp. 803–820). Springer Verlag. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Matias, D., Balça-Silva, J., da Graça, G. C., Wanjiru, C. M., Macharia, L. W., Nascimento, C. P., Roque, N. R., Coelho-Aguiar, J. M., Pereira, C. M., Dos Santos, M. F., Pessoa, L. S., Lima, F. R. S., Schanaider, A., Ferrer, V. P., e Spohr, T. C. L. de S., & Moura-Neto, V. (2018). Microglia/astrocytes–glioblastoma crosstalk: Crucial molecular mechanisms and microenvironmental factors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(August), 1–22. doi: 10.3389/fncel.2018.00235
- Moura-Neto, V., Kahn, S. A., Biasoli, D., Garcia, C., Geraldo, L. H. M., Pontes, B., Sobrinho, M., Bon Frauches, A. C., Romão, L., Soletti, R. C., dos Santos Assunção, F., Tovar-Moll, F., de Souza, J. M., Lima, F. R. S., & Anderlueh, G. (2012). Equinatoxin II potentiates temozolomide and etoposide-induced glioblastoma cell death. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *12*(19), 2082–2093. doi: 10.2174/156802612804910250
- Nabors, L. B., Portnow, J., Ammirati, M., Baehring, J., Brem, H., Butowski, N., Fenstermaker, R. A., Forsyth, P., Hattangadi-Gluth, J., Holdhoff, M., Howard, S., Junck, L., Kaley, T., Kumthekar, P., Loeffler, J. S., Moots, P. L., Mrugala, M. M., Nagpal, S., Pandey, M., ... Engh, A. (2017). Central nervous system cancers, version 1.2017 featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *15*(11), 1331–1345. doi: 10.6004/jnccn.2017.0166
- Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M., & Saltzman, W. M. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, Issue 7, pp. 701–705). Elsevier. doi: 10.1016/j.addr.2011.12.006
- Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S. R., Aroca-Aguilar, J. D., Sánchez, P., Mira, H., Escribano, J., & Fariñas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nature Neuroscience*, *9*(3), 331–339. doi: 10.1038/nn1657
- Roggendorf, W., Strupp, S., & Paulus, W. (1996). Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathologica*, *92*(3), 288–293. doi: 10.1007/s004010050520
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, *18*(1–2), 43–73. doi: 10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., ... Mirimanoff, R. O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, *10*(5), 459–466. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Wirsching, H. G., & Weller, M. (2016). The Role of Molecular Diagnostics in the Management of Patients with Gliomas. In *Current Treatment Options in Oncology* (Vol. 17, Issue 10, p. 51). Springer New York LLC. doi: 10.1007/s11864-016-0430-4

SESIÓN C2

PARÁMETROS MICORRÍCICOS EN MAÍZ O TRIGO TRAS DIFERENTES TIPOS DE CULTIVOS CUBIERTA

Ulcuango, Kelly; Centurión, Nelly Soledad
Tutores: Mariscal-Sancho, Ignacio; Hontoria, Chiquinquirá
Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.
Correo electrónico (AUTORAS): kdc.ulcuango@alumnos.upm.es

RESUMEN

Los cultivos cubierta (CC) fomentan numerosos servicios ecosistémicos de los suelos agrícolas como los aportados por los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Sin embargo, los efectos pueden ser muy diferentes en función del tipo de CC empleado, del cultivo principal (CP) que hereda el efecto y del tiempo de permanencia del CC. En este trabajo se analizan los efectos de diferentes tipos de CC, especialmente sus mezclas, sobre algunos parámetros micorrícicos y sus beneficios en la nutrición y crecimiento del subsiguiente CP (maíz o trigo) durante dos ciclos de rotación de cultivos. Para ello, se diseñó un experimento en condiciones semicontroladas con dos factores de estudio. Se evaluaron tres especies de CC (dos leguminosas y una gramínea) en monocultivo y en mezcla, además de un control sin CC, en combinación con dos especies de CP subsiguientes. Se midió la colonización micorrícica, la longitud de hifas extrarradicales, la biomasa vegetal total y el fósforo (P) en planta. Los resultados indicaron una fuerte interacción entre los tipos de CC y el subsiguiente CP y sugieren que las mezclas de CC favorecen los parámetros micorrícicos, pero sus efectos disminuyen con el paso del tiempo. La elección de especies de CC, sus mezclas y la interacción con el subsiguiente CP puede tener efectos importantes en los microorganismos del suelo, por lo que es necesario investigar más y contribuir así a la toma de decisiones para una agricultura más sostenible.

Palabras clave: longitud de hifas extrarradicales, biomasa vegetal total, fósforo.

INTRODUCCIÓN

El uso de los cultivos cubierta (CC) en sustitución de un barbecho ofrece beneficios medioambientales (Schipanski et al., 2014) como el mejoramiento de la aireación e infiltración del agua (García-González et al., 2016), la fijación del nitrógeno atmosférico para ponerlo a disposición del siguiente cultivo, y el aumento del inóculo de hongos micorrícicos en el suelo que favorecen la micorrización del subsiguiente cultivo principal (Lu et al., 2000), entre otros. Sin embargo, los beneficios que aportan los CC difieren de la especie que se utilice. Por ejemplo, las gramíneas pueden aportar una mayor cantidad de materia orgánica y aumentar el rendimiento del cultivo subsiguiente (Snapp et al., 2005). Las leguminosas en cambio fijan N atmosférico para ser usado por el siguiente cultivo y así reducir el uso de fertilizantes nitrogenados (Snapp et al., 2005). Los CC de leguminosas además pueden aumentar la abundancia de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Benitez et al., 2016), pero la capacidad de legarlos al cultivo sucesor parece ser menor que la de las gramíneas. Así, en comparación con una veza, el uso de la cebada como CC estimula en mayor medida la micorrización del subsiguiente cultivo principal (García-González et al., 2016, 2018). En cuanto a las mezclas de especies de CC, estas pueden aumentar la biodiversidad de la microbiota del suelo (Vukicevich, et al., 2016), pero existe discrepancia con respecto a su efecto en distintos grupos de microorganismos (Buyer et al., 2017; Finney et al., 2017). Finalmente, se ha demostrado que algunos parámetros micorrícicos como la colonización y la longitud de hifas extrarradicales pueden ser sensibles al tiempo de permanencia del cultivo cubierta (García-González et al., 2018). Con estos antecedentes, resulta necesario profundizar en

el estudio de los efectos de diferentes tipos de CC, especialmente sus mezclas, sobre los HMA del suelo y sus beneficios en la nutrición y crecimiento del subsiguiente CP a lo largo del tiempo. Por lo tanto, en este trabajo se ha estudiado el legado de cultivos cubierta comunes sobre una selección de parámetros micorrícicos y vegetales evaluados en dos cultivos principales diferentes durante dos ciclos de rotación de cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron macetas de 18x18x25.5 cm y un sustrato en una mezcla (1:2) de arena y suelo. El suelo de partida (pH=8.3 ± 0.11, textura franca y MO= 1.13% ± 0.03) se tomó del horizonte superficial de un Haploxeralf cálcico situado en la Finca la Canaleja (Madrid) con bajo contenido en nutrientes. Los factores de estudio fueron: 1) el tipo de cultivo cubierta (TCC) con tres especies en monocultivo: veza (*Vicia sativa* L.) (VEZ), melilotus (*Melilotus officinalis* L.) (MEL), cebada (*Hordeum vulgare* L.) (CEB) y dos mezclas de los anteriores, cebada con veza (C+V) y cebada con melilotus (C+M), además de un control sin CC (CON); y 2) el tipo de cultivo principal (CP) con dos especies: maíz y trigo. Los 12 tratamientos resultantes (6x2) se distribuyeron al azar en 5 bloques (total 60 microcosmos). El experimento se desarrolló durante dos ciclos de rotación de cultivos bajo condiciones controladas y se aplicó una estrategia de bajo nivel de riego y fertilización en línea con una agricultura de bajos insumos. En cada ciclo, los CC crecieron en torno a 3 meses y los CP 2 meses, puesto que se pretendía evaluar la herencia de CC en fases tempranas del CP. Se tomaron muestras de suelo y de planta del CP al final de cada ciclo. Como parámetros microbiológicos, se determinaron el porcentaje de colonización micorrícica en raíces (Vierheilig et al., 1998) y la longitud de hifas extrarradicales (García-González et al., 2016). Además, se midió la humedad del suelo y se cuantificó la biomasa vegetal total de la planta (aérea y radical) y el contenido de P en la parte aérea. Se aplicó un análisis de varianza con un modelo lineal general (Statgraphics Centurion XVIII) para un diseño en bloques con dos factores, asegurando la linealidad, normalidad y homocedasticidad de los datos. Las diferencias entre las medias se evaluaron usando el Test de Fisher para p-valor < 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron efectos importantes tanto de los CC como de los subsiguientes CP en la mayoría de las variables analizadas, así como una fuerte interacción entre ambos factores de estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los resultados ANOVA para parámetros microbiológicos, humedad del suelo, biomasa vegetal total y concentración de P en planta según el tipo de cultivo cubierta y tipo de cultivo principal y su interacción.

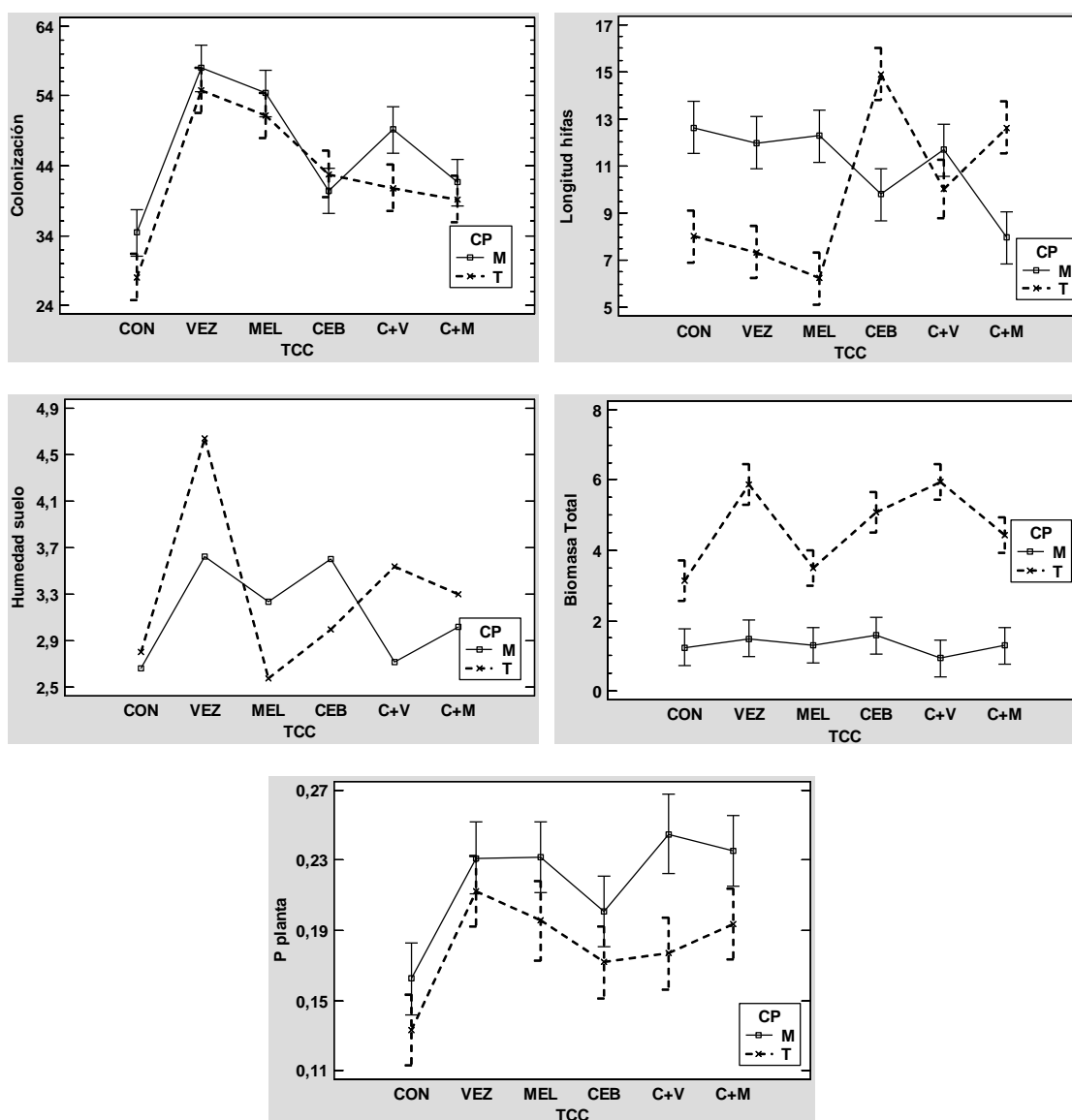
	Colonización (%)		Longitud de hifas (cm/g)		Humedad suelo (%)		Biomasa vegetal total (g)		P planta (g/100g)	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Tipo de CC	***	***	**	*	ns	ns	***	ns	***	ns
Tipo de CP	*	***	*	ns	ns	ns	***	***	***	ns
TCC * CP	ns	*	***	ns	ns	ns	***	*	ns	ns

CC: cultivo cubierta; CP: cultivo principal; C1: primer ciclo de rotación de cultivos; C2: segundo ciclo de rotación de cultivos; * p-valor < 0.05; ** p-valor < 0.01; *** p-valor < 0.001; ns: no significativo (p-valor > 0.05).

En el primer ciclo de rotación de cultivos, todos los CC mejoraron la colonización micorrícica en ambos CP a diferencia del control (p<0.05) y los monocultivos de leguminosas fueron los tratamientos que mostraron valores más altos. Por otro lado, en el trigo, los CC de monocultivos de leguminosas disminuyeron las longitudes de hifas frente

al CC de cebada, mientras que los CC de las mezclas tuvieron un comportamiento intermedio entre la cebada y las leguminosas (Fig.1). En el caso del CP de maíz, la mezcla de cebada con melilotus presentó el valor más bajo de longitud de hifas. La humedad del suelo tras el monocultivo de veza fue mayor en comparación al monocultivo de melilotus y al control. En cuanto al crecimiento de la planta, la mezcla de cebada con veza y el monocultivo de veza incrementaron la biomasa vegetal total en el trigo comparado con el control sin CC, mientras que el monocultivo de cebada mostró un efecto positivo en el crecimiento del maíz. Finalmente, el contenido de P en planta fue mayor tras las mezclas de CC y de los monocultivos de leguminosas en comparación con el control y el monocultivo de cebada (Figura 1).

Figura 1. Colonización micorrícica (%), longitud de hifas extrarradicales (cm/g), humedad del suelo (%), biomasa vegetal total (g) y contenido de P (g/100g) en plantas de maíz (M) y trigo (T) en el primer ciclo de rotación de cultivos. Las barras indican intervalos de 95% Fisher.



En el segundo ciclo (datos no mostrados), los tratamientos con mezclas de CC mostraron los valores más altos de colonización micorrícica en trigo, mientras que, la mezcla de cebada con veza destacó en el maíz. La mezcla de cebada con melilotus y el monocultivo

de cebada incrementaron la longitud de hifas en comparación con el control en el CP de trigo. Estos resultados coinciden en parte con los obtenidos en García-González et al. (2018), donde los parámetros más altos de colonización micorrícica y longitud de hifas fueron observados después del CC de cebada sola. Posiblemente, la buena adaptación de la cebada y su capacidad de legar los beneficios de los HMA favoreció las mezclas con cebada en comparación con el monocultivo de leguminosas.

La humedad del suelo fue mayor tras la mezcla de cebada con veza y los monocultivos de melilotus y cebada, a diferencia de la mezcla de cebada con melilotus que presentó la menor humedad. Con respecto al crecimiento de la planta, las mezclas de CC redujeron la biomasa vegetal total en el trigo comparado con el control sin CC, mientras que el monocultivo de cebada mostró un efecto positivo en el crecimiento del maíz. Otros estudios han demostrado que la rotación de una gramínea como CC (ray grass) y el maíz como CP muestra un buen desempeño en términos de acumulación de biomasa y cobertura del suelo (Caswell et al., 2019). Sin embargo, a pesar de los efectos positivos de algunos tipos de CC en los parámetros micorrícicos, no se observaron diferencias significativas en el P de los dos cultivos principales tras el segundo ciclo de rotación de cultivos en contraposición con lo observado en el primer ciclo

CONCLUSIONES

El tipo de CC y su modo de implementación (monocultivo o mezcla) tuvieron un efecto diferenciado sobre los hongos micorrícicos arbusculares del suelo, la nutrición y el crecimiento del subsiguiente cultivo principal. El efecto de los CC en el segundo ciclo fue menor que en el primero. De particular interés son las mezclas que favorecieron algunos de los parámetros estudiados. Es necesario profundizar en el estudio de la interacción de los CC y su interacción con los CP a lo largo del tiempo para aclarar los mecanismos involucrados y verificar los efectos en el rendimiento final del cultivo.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue financiada por AGRISOST (S2013 / ABI-2717), el proyecto de plan nacional "AGL2017-83283-C2-1-R" y el programa de becas SENESCYT 2017 del Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Benitez, M., Taheri, W., Lehman, R., 2016. Selection of fungi by candidate cover crops. *Appl. Soil Ecol.*, 103: 72–82.
- Buyer, J., Baligar, V., Virupax, C., He, Z., Arévalo-Gardini, E., 2017. Soil microbial communities under cacao agroforestry and cover crop systems in Peru. *Appl. Soil Ecol.* 120: 273-280.
- Caswell, K., Wallace, J., Curran, W., Mirsky, S., Ryan, M., 2019. Cover crop species and cultivars for drill-interseeding in Mid-Atlantic corn and soybean. *Agron. J.* 111: 1060–1067.
- Finney, D., Buyer, J., Kaye, J., 2017. Living cover crops have immediate impacts on soil microbial community structure and function. *J. Soil Water Conserv.* 72: 361–373.
- García-González, I., Quemada, M., Gabriel, J.L., Hontoria, C., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal activity responses to winter cover crops in a sunflower and maize cropping system. *Appl. Soil Ecol.*, 102: 10–18.
- García-González, I., Quemada, M., Gabriel, J. L., Alonso-Ayuso, M., Hontoria, C., 2018. Legacy of eight-year cover cropping on mycorrhizae, soil, and plants. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 181(6): 818-826.
- Lu, Y., Watkins, K., Teasdale, J., Abdul-Baki, A., 2000. Cultivos cubierta en la producción sostenible de alimentos. *Food Internacional*, 16: 121-157.
- Schipanski, M., Barbercheck, M., Douglas, M., Finney, D., Haider, K., Kaye, J., Kemanian, A., Mortensen, D., Ryan, M., Tooker, J., White, C., 2014. A framework for evaluating ecosystem services provided by cover crops in agroecosystems. *Agr. System*, 125: 12-22.
- Snapp, S., Swinton, R., Labarta, D., Mutch, J., Black, R., Leep, J., Nyiraneza, K., 2005. Evaluating cover crops for benefits, costs and performance within cropping system niches. *Agron. J.*, 97: 322-332.
- Vierheilig, H. 1998., Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 5004-5007.
- Vukicevich, E., Lowery, T., Bowen, P., Úrbez-Torres, J., Hart, M., 2016. Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. *Agron. Sustain. Dev.* 36:48.

THE WONDROUS SEARCH OF THE MYCOVIROME OF *BOTRYTIS CINEREA*

Ruiz Padilla, Ana¹

Tutora: Ayllón Talavera, María Angeles^{1,2}

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, CBGP (UPM-INIA)

²Dept. Biotecnología-Biología Vegetal, ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid
Correo electrónico (AUTORA): ana.ruizp@upm.es

ABSTRACT

Botrytis cinerea is an important necrotrophic plant pathogen that infects grapevine, among other plants. It causes high economic losses worldwide, especially in Spain, where vineyards are essential for the wine industry. Some viruses (or mycoviruses) present in fungi induce hypovirulence and can be used as an alternative treatment to traditional fungicides. The purpose of this project was to analyze the mycovirome of *Botrytis cinerea* in Spain and Italy and identify new hypovirulent isolates.

Key words: *Botrytis cinerea*, grapevine, mycoviruses

INTRODUCTION

Botrytis cinerea is a worldwide distributed fungus which infects more than 1400 plant species. It causes gray rot in more than 200 cultivars at harvesting and post-harvesting and produces economic losses of more than 10 billion \$ (Hua et al., 2018). In Spain, this fungus mainly affects grapevine (*Vitis vinifera* L.), one of the most important crops in our country. In fact, Spain owns the most extensive area of vineyards in Europe, and it has been established as the main wine producer (Eurostat, 2020).

Botrytis cinerea is difficult to control because it can infect in different ways and can act as an inoculum source from other hosts. It can also survive as sclerotia, mycelia and conidia during long periods. The main fungicides against it are the “botrycides”, chemical substances that inhibit their growth. Nevertheless, fungi can adapt to them by the high abundance of resistant species among the populations (Shawn et al., 2016). Chemical fungicides are also a public concern for the health and the environment, so it is important to find other alternatives.

One of these is the biological and biotechnological control based on hypovirulent mycoviruses. Mycoviruses are viruses which infect filamentous fungi, mold and oomycetes. It has been described that some of them can naturally mitigate the symptoms (Hao et al., 2018; Kamaruzzaman et al., 2019, Yu et al., 2013, Wu et al., 2010). The purpose of this project was to identify the mycovirome of *Botrytis cinerea* isolated from grapevine and search for possible candidates.

MATERIAL AND METHODS

This project consists of two main parts: the isolation and RNA extraction of *Botrytis cinerea* from grapevine and the bioinformatic analysis to detect the mycoviruses.

Isolation of *Botrytis cinerea* and total RNA extraction

Two hundred forty-eight samples used in this study were collected during the summer of 2018 in Italy and Spain on several varieties of grapevine plants infected with *Botrytis cinerea*. A total of 150 Spanish samples were collected in four of the main grapevine producing areas of Spain: Jerez in the south, Ribera de Duero in the Center-North West, La Rioja in the North, and Penedés in the North-East (Figure 1). Samples were isolated from different grapevine cultivars as Tempranillo, Palomino or Macabeu. A total of 98 Italian samples were collected mainly in the north of Italy, covering different areas, from

16 de junio 2020

Piemonte to Veneto. This also reflected a wide range of grapevine varieties as Dolcetto, Barbera, Gropello, Cabernet, Merlot, Chardonnay and many others (Figure 1).

After collection, the infected grapes were immediately stored at 4°C in a moist bag until its isolation in Potato Dextrose Agar (PDA). The mycelium of each fungal sample was isolated from the infected grapes with a sterile tip and plated in a potato dextrose agar plate that was incubated at 23 °C in darkness until the mycelia were completely developed.

For determination of the fungal species, specific primers for the species cinerea were used in a qPCR using as template total fungal DNA. Each isolate was cultured in a plate with Potato Dextrose Broth (PDB) for 3 days. The mycelia were collected, dried using Miracloth paper and frozen in liquid nitrogen and maintained at -80° C until total RNA extraction.

Total RNA was extracted from 100 mg of mycelia with Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Extracts quality and concentration were measured at UV spectrophotometer and electrophoresis gels. The high-quality samples were pooled together, resulting in 17 pools from Spain and 12 pools from Italy. Pools features are shown in Table 1.

Table 1. Pools sequenced by NGS with the number of samples included in each one and the total number of samples per region

Pool	Region	Total	Samples/ Pool
BCS1	Jerez	29	10
BCS2			10
BCS3			9
BCS4			7
BCS5	Ribera del Duero	45	8
BCS6			9
BCS7			12
BCS8			9
BCS9	Penedés	33	10
BCS10			7
BCS11			9
BCS12			7
BCS13	La Rioja	43	4
BCS14			12
BCS15			10
BCS16			9
BCS17			8
BCI1	Lombardía	19	10
BCI2			9
BCI3			8
BCI4	Piemonte	46	8
BCI5			11

BCI6			10
BCI7			9
BCI8			8
BCI9	Veneto	26	8
BCI10			10
BCI11	Basilicata	3	3
BCI12	Sicilia	4	4

Bioinformatic analysis

RNA sample pools were sent to library preparation (Illumina TrueSeq) and sequence analysis. For each library, more than 100 million pair ended reads, 150 bases long were retrieved. The bioinformatics pipeline had as main objectives assembling and identifying the viruses *in silico*. It was divided into 4 steps: (A) cleaning, (B) *de novo* assembly, (C) viral sequence identification and (D) mapping.

The first step was to clean reads from adapters, artefacts, short reads and ribosomal sequences. Then, resulted reads were then *de novo* assembled to build longer sequences (*contigs*). The third step was to look for viral sequences by blasting contigs against a custom viral database. The results were manually inspected to select reliable viral sequences, based on identity percentage, alignment length and query length. A second blast was run against all the NCBI database to discriminate between real viruses and integrated viruses or host sequences. Finally, selected viruses were mapped on clean reads to obtain the abundance.

Open Reading Frames were predicted by Expasy Translate tool and Blastp tool was used to confirm the identity of the translated proteins by searching again in the database. All viral sequences with a length over 1000 nt, close to the size of the reference genome, and with a complete coding sequence or missing few aminoacids from the amino o carboxyl terminal were submitted to the GenBank database.

Viruses were classified in (A) new, (B) non-described and (C) already described viruses in *Botrytis cinerea*, following demarcation criteria for each genus.

RESULTS

A total number of 99 viruses were found in *Botrytis cinerea* isolates. Some viruses were highly abundant in all pools, based in the number of reads sequences, and were homogeneously distributed along all regions of Spain and Italy. However, other were exclusive of some pools, indicating that they were replicating at a low title or that they were exclusive of some regions o locations.

Viruses were divided into three groups, 74 that were new viruses, 15 that had not been described in *Botrytis cinerea* and 10, already described in this specie. The virus had different genome types: double-stranded RNA, positive sense single-stranded RNA, negative-sense single-stranded RNA and ssDNA. Specific groups and their frequency are shown in Table 2.

Table 2. Groups of viruses found in the sample and frequency of them.

Genome type	Group	Number of viruses
ssRNA (+)	Alphavirus	1
	Botoulivirus	1

	Botourmiaviridae	18
	Deltaflexivirus	2
	Endornaviridae	2
	Fusarivivirus	5
	Hypovirus	7
	Mitovirus	11
	Mycoflexivirus	1
	Narnavirus	6
	Flexiviridae	1
	Tymovirales	1
	Umbravirus	3
dsRNA	Bipartite virus	1
	Botybinavirus	2
	Partitiviridae	4
	Quadrvirus	3
	Other dsRNA viruses	3
	Victorivirus	11
ssRNA (-)	Orthobunyavirus	2
	Bunyavirales	5
	Others sRNA negative-strand virus	4
ssDNA	Genomoviridae	1

CONCLUSIONS

Botrytis cinerea isolates from several varieties of grapevine plants of Spain and Italy have a wide variety of mycoviruses. Mitovirus and hypovirus have been already described as hypovirulent, so some of these could be further studied and characterized in the isolates. Nevertheless, the identification of these viruses has been made *in silico*, and it would be necessary to detect them *in vivo* by conventional or quantitative PCR, among other molecular techniques.

Acknowledgments

I would like to thank María Angeles Ayllón, Irene Gómez Cid and Julio Rodríguez their help in some of the parts of this project.

BIBLIOGRAPHY

- Eurostat. 2020. Vineyards in the EU – statistics. Statistics explained
- Hao F., Ding T., Wu M., Zhank J., Yank L., Chen W., Li G. 2018. Two novel hypovirulence-associated mycoviruses in phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*: molecular characterization and supression of infection cushion formation. *Viruses* 10(5):254
- Hua L., Yong C., Zhanquan Z., Boqiang L., Guozheng Q., Shiping T. 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety* 2:111-119.
- Kamaruzzaman M., He G., Wu M., Zhang J., Yang L., Chen W., Li G. 2019. A novel partitivirus in the hypovirulent isolate QT5-19 of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Viruses* 11: 24
- Shawn M.W., Emmanuel C.J., Emlilda D., Terhem R.B., Shafia A., Tsamaidi D., Emblow M. 2016. Analysis of Cryptic, Systemic *Botrytis* Infections in Symptomless Hosts, *Front Plant Sci.* 7:625.
- Yu X., Li B., Xie J., Cheng J., Ghabrial S.A., Yi X., Jiang D. 2013. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *PNAS.* 110:1452-57
- Wu M., Zhank L., Li G., Jiang D., Ghabrial SA. 2010. Genome characterization of a debilitation associated mitovirus infecting the phytopatogenical fungus *Botrytis cinerea*. *Virology* 406:117-126

ENSILADO DE TYPHA: UNA OPORTUNIDAD PARA ALIMENTAR A LOS PEQUEÑOS RUMIANTES EN NIGERIA

Villacrés, Raquel; de Evan, Trinidad

Tutora: Carro Travieso, María Dolores

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid

Correo electrónico (AUTORA): raquelvillacres@gmail.com

RESUMEN

En Nigeria existe un gran crecimiento de typha (*Thypha domingensis*), una planta colonizadora que genera graves inconvenientes a los agricultores y a la población en general. La utilización de esta planta en la alimentación de los pequeños rumiantes podría ser una alternativa para reducir su crecimiento incontrolado. El objetivo de este trabajo fue analizar la posibilidad de conservar la typha mediante ensilado. Para ello se prepararon cuatro tipos de ensilados: typha original no enriquecida (control); typha con ácido fórmico; typha con urea y melaza; y typha con ácido fórmico, urea y melazas y se analizaron sus características y composición química. Únicamente el ensilado de typha con ácido fórmico presentó valores de pH (4,75) dentro de los recomendados para un buen proceso de ensilado (pH < 5,0). Las características de los ensilados control y enriquecidos con urea y melaza indican que posiblemente se produjo un crecimiento de enterobacterias y/o de microorganismos clostridiales, por lo que estas condiciones de ensilado no fueron adecuadas y se debería reducir la cantidad de urea añadida. Se necesitan más estudios para determinar los aditivos idóneos para un buen ensilado de la typha.

Palabras clave: Typha, ensilados, pH

INTRODUCCIÓN

La typha o enea (*Thypha domingensis*) es una planta colonizadora con crecimiento invasivo que se distribuye ampliamente por todo el mundo, encontrándose en Europa, Asia, Norteamérica y África. En el valle de Hadejia en el norte de Nigeria, la typha está ampliamente extendida y su crecimiento afecta negativamente a la productividad de los arrozales, bloquea los canales de agua, dificulta el flujo de los ríos, la navegación y la pesca, lo que aumenta los riesgos de inundación, afecta negativamente a la biodiversidad de estos ecosistemas y favorece la persistencia de enfermedades transmitidas por el agua (Iglesias et al., 2018). En Nigeria hay 57,3 millones de ovejas y 38,5 millones de cabras que son vitales para la supervivencia de numerosas familias y cuya alimentación se ve comprometida durante la estación seca. La typha podría usarse en la alimentación de los rumiantes, contribuyendo a la sostenibilidad de las granjas ganaderas locales y reduciendo el impacto negativo que provoca su crecimiento. Sin embargo, su valor nutritivo es bajo (de Evan et al., 2019), por lo que su picado y ensilado usando aditivos como fuentes de nitrógeno y energía podría mejorar su valor nutritivo. Por ello, es necesario investigar las condiciones de ensilado que pueden servir para conservar la typha y mejorar su valor nutritivo. Así pues, el objetivo de este trabajo, realizado en el marco de la Plataforma África financiada por la Universidad Politécnica de Madrid, fue analizar las características y composición química de diferentes ensilados de typha para su uso en la alimentación de los pequeños rumiantes en Nigeria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se obtuvieron 20 kg de plantas de typha joven (< 1,5 m de altura) que se secaron al sol durante 12 horas para lograr un contenido en materia seca (MS) entre 30 y 35%. A continuación, se cortaron con tijeras en trozos de 2 cm² de tamaño y se mezclaron bien antes de utilizarlas para preparar tres réplicas de cuatro tipos diferentes de ensilados, obteniendo un total de 12 ensilados. Estos fueron preparados en bolsas de

plástico (40 x 30 cm) que se cerraron con una envasadora al vacío. Cada ensilado contenía 400 g de material vegetal y diferentes aditivos. Los cuatro tipos de silos preparados fueron: CON: typha original no enriquecida, utilizado como ensilado control; CF: typha con ácido fórmico (4 ml / kg de typha fresca); CUM: typha con urea y melaza (1,9% y 3,4% de la mezcla final, respectivamente); y CFUM: typha con ácido fórmico, urea y melaza en las proporciones indicadas anteriormente. En el ensilado CFUM se reprodujeron las condiciones utilizadas por los ganaderos de Nigeria. Los silos se almacenaron durante 120 días a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, se abrieron, se valoraron visual y organolépticamente, y se procesaron para determinar su contenido de materia seca, pH, ácidos grasos volátiles y composición química.

El procesado de los ensilados consistió en vaciar cada bolsa y pesar su contenido, homogeneizarlo, y tomar una muestra representativa de 50 g que se mezcló con 500 ml de agua desionizada. La mezcla se homogeneizó dos veces en una picadora de cuchillas durante 40 segundos y se filtró a través de 4 capas de gasa siguiendo el procedimiento descrito por Samarasinghe et al. (2019). En el líquido obtenido se midió el pH usando un pHmetro Crison 20 (Crisson Instruments, Barcelona, España) y se tomó una muestra de 2 ml que se mezcló con 40 μ l de H₂SO₄ (20%; vol / vol) para analizar su concentración en ácidos grasos volátiles (VFA). Las muestras se tomaron por duplicado y se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Además, se tomaron dos muestras de 100 g de cada silo, se congelaron y se liofilizaron para determinar su contenido en MS y su composición química. Para los análisis de composición química, se molieron las muestras liofilizadas a 1 mm y se determinó su contenido en cenizas, proteína bruta (PB) y extracto etéreo (EE) según los procedimientos descritos por la AOAC (2005). La concentración en fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina (LIG) se determinó según los métodos descritos por Van Soest et al. (1991).

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis estadístico factorial en el que los factores fueron la adición de ácido fórmico, la adición de urea y melazas, y la interacción entre ambos factores. Para los análisis estadísticos se usó el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS Inst. INC., Cary, NC, EEUU). Cuando el efecto de algún factor fue significativo ($p < 0,05$) las medias se compararon mediante el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los ensilados presentaron un olor característico dulce-vinagroso y un color verdoso normal, propios de este método de conservación de forrajes, excepto los ensilados con urea y melazas (CUM), que tenían un fuerte mal olor y color oscuro. En la Tabla 1 se muestra el contenido de cada silo (g de material vegetal) y porcentaje de materia seca de los diferentes ensilados, además del pH y la cantidad de ácidos grasos volátiles que contenían sus extractos. La cantidad de material vegetal fue mayor ($p < 0,001$) en los ensilados con urea y melazas añadidos debido a la adición de estos dos productos. En cuanto a la materia seca, se observó un 4% más de MS ($p < 0,05$) en los ensilados con ácido fórmico frente a los que no se les había añadido ácido.

El pH fue alto en la mayoría de los ensilados y únicamente alcanzó los valores recomendados ($pH < 5,0$) en el ensilado CF ($pH = 4,75$), siendo este valor inferior al del resto de ensilados ($p < 0,05$). La adición de ácido fórmico redujo ($p < 0,001$) el pH de los ensilados, mientras que la suplementación con melazas y urea tuvo un efecto contrario, obteniéndose valores de pH muy por encima de lo recomendado. Este efecto se atribuyó a una elevada producción de amoníaco procedente de la fermentación de la alta cantidad de proteína (15,2 y 22,2% en CUM y CFUM, respectivamente; Tabla 2) que tienen estos ensilados. Un alto pH en los ensilados puede indicar una conservación inadecuada del material vegetal, ya que se puede producir un crecimiento bacteriano indeseado que lo deteriore (Garcés Molina et al., 2004). Los ensilados con un pH más alto de lo normal se pueden producir por una alta capacidad de amortiguación del material vegetal como, por

ejemplo, cuando tiene contenidos altos en proteína y cenizas (Kung et al., 2018). Esto podría explicar los altos valores de pH observados en los ensilados enriquecidos con urea (8,50 y 7,70 en CUM y CFUM, respectivamente), ya que durante la fermentación del ensilado la urea se transforma fácilmente en amoníaco, que es un compuesto con una alta capacidad tampón. De hecho, la adición de ácido fórmico al ensilado CUM no logró reducir los valores de pH a niveles adecuados en el ensilado CFUM.

El extracto del ensilado CUM tuvo mayor cantidad de AGV totales, seguido del ensilado CON. El uso de ácido fórmico redujo ($p < 0,001$) la cantidad de AGV totales, mientras que la adición de urea y melazas aumentó ($p = 0,007$) esta cantidad, posiblemente debido a la fermentación de las melazas. Los ensilados con urea y melazas presentaron una mayor concentración de acético, lo que podría indicar un posible crecimiento de enterobacterias, las cuales degradan las proteínas a amoníaco y fermentan los azúcares a ácido acético (Kung et al., 2018). Esta hipótesis se sustenta en el fuerte mal olor y color oscuro del ensilado CUM, que fue el que presentó la mayor concentración de ácido acético (46,1 g/kg MS). La adición de ácido fórmico redujo ($p \leq 0,015$) la concentración de todos los AGV analizados, posiblemente debido a una reducción del crecimiento de estas bacterias provocado por un menor pH. El ensilado CON presentó elevadas concentraciones de ácido propiónico y butírico, la presencia de estos dos ácidos en los ensilados debe de ser mínima o indetectable y su aparición es característica de una posible fermentación por microorganismos clostridiales (Kung et al., 2018). La fermentación clostridial indeseada se puede evitar con la producción rápida de ácido láctico en el ensilado, ya que los clostridios son intolerantes a la alta presión osmótica y el pH bajo que se propicia con el ácido láctico. Posiblemente la adición de ácido fórmico a los ensilados CF y CFUM ayudase a evitar este tipo de fermentación, debido al perfil de AGV que presentan, aunque el pH de CFUM estuviera por encima de los límites recomendados.

Tabla 1. Características de ensilados de typha sin aditivos (CON), con ácido fórmico (CF), con urea y melazas (CUM), y con ácido fórmico, urea y melazas (CFUM)

	Ensilado ¹				EEM ⁴	p		
	CON	CF	CUM	CFUM		Fórmico	Urea+ melaza	Fórmico x urea+melaza
Materia fresca (g)	410 ^a	404 ^a	440 ^b	442 ^b	3,4	0,627	< 0,001	0,268
Materia seca (%)	31,0 ^a	34,8 ^b	30,7 ^a	35,0 ^b	1,07	0,005	0,966	0,847
pH	5,39 ^b	4,75 ^a	8,50 ^d	7,70 ^c	0,114	< 0,001	< 0,001	0,513
AGV ² (g/kg MS)								
Acético	16,6 ^b	8,86 ^a	46,1 ^c	13,7 ^{ab}	1,15	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Propiónico	3,84 ^b	0,22 ^a	0,99 ^a	0,88 ^a	0,603	0,015	0,107	0,020
Butírico	17,2 ^b	0,76 ^a	11,8 ^b	4,84 ^a	2,340	0,001	0,800	0,080
Otros AGV ³	4,47 ^c	0,19 ^a	1,30 ^b	0,00 ^a	0,398	< 0,001	0,003	0,006
Total AGV	42,0 ^c	10,0 ^a	60,2 ^d	19,4 ^b	3,78	< 0,001	0,007	0,276

a, b, c, d Dentro de cada parámetro, medias en la misma fila con distinto superíndices son diferentes ($P < 0,05$).
¹ Ácido fórmico: 4 ml/kg; urea: 1,9% mezcla final; melazas: 3,4% de la mezcla final. ² AGV: ácidos grasos volátiles. ³ Otros AGV: suma de isobutírico, isovalérico y valérico. ⁴ EEM: error estándar de la media.

En cuanto a la composición química de los ensilados de typha, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ensilados en todas las fracciones analizadas excepto en la FAD (Tabla 2). La adición de ácido fórmico dio lugar a ensilados con menos cenizas y lignina. El enriquecimiento de los ensilados con urea y melazas aumentó el porcentaje de

PB y EE, y redujo el contenido en FND. En general, el enriquecimiento de los ensilados con urea y melaza aumentó el contenido en PB y EE y disminuyó el contenido en fibra y lignina del mismo, pero no se logró reducir el pH hasta los valores deseados. Los resultados muestran un menor contenido en MS y mayor contenido en PB que los obtenidos por WingChing-Jones y Leal (2017), quienes estudiaron la conservación de la typha mediante ensilados con un 3% de melaza y cantidades crecientes de urea. Los resultados indican que la cantidad de urea usada en nuestro estudio fue excesiva y se recomienda su reducción al 0,5% de la mezcla final para obtener un ensilado con un contenido proteico alto para complementar a otros alimentos disponibles en Nigeria que son deficitarios en proteína (p.e. paja de sorgo).

Tabla 2. Composición química (g / 100 g materia seca) de ensilados de typha sin aditivos (CON), con ácido fórmico (CF), con urea y melazas (CUM), y con ácido fórmico, urea y melazas (CFUM)

	Ensilado ¹				EEM ²	p		
	CON	CF	CUM	CFUM		Fórmico	Urea+melaza	Fórmico x urea+melaza
Cenizas	12,3 ^b	11,7 ^a	13,5 ^c	12,3 ^b	0,116	< 0,001	< 0,001	0,033
Proteína bruta	11,4 ^a	11,5 ^a	15,2 ^b	22,2 ^c	0,258	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Extracto etéreo	3,97 ^{ab}	3,69 ^a	4,64 ^b	4,89 ^b	0,226	0,721	0,020	0,294
Fibra neutro detergente	69,4 ^b	70,2 ^b	66,6 ^a	64,3 ^a	0,76	0,323	< 0,001	0,073
Fibra ácido detergente	41,1	40,4	41,5	39,5	1,08	0,233	0,818	0,562
Lignina	6,92 ^b	6,31 ^a	7,33 ^b	6,58 ^a	0,164	0,003	0,069	0,674

^{a, b, c} Dentro de cada parámetro, medias en la misma fila con distinto superíndices son diferentes (p<0,05). ¹ Ácido fórmico: 4 ml/kg; urea: 1,9% mezcla final; melazas: 3,4% de la mezcla final. ² EEM: error estándar de la media.

CONCLUSIONES

El enriquecimiento de ensilados de typha con ácido fórmico y/o urea y melazas modificó la composición química y las características del ensilado. Únicamente en el ensilado de typha con ácido fórmico se obtuvieron valores de pH recomendados para un buen proceso de ensilado, por lo que no se recomiendan el resto de ensilados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto Plataforma África financiado por la Universidad Politécnica de Madrid.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. (18th ed.), AOAC International, Rockville, MD (EE.UU.)
de Evan T.; Marcos C.N.; Carro M.D.; Alao J.S.; Makinde J.O.; Rufai M.A.; Iglesias E.; Escribano F. 2019. Animal Science Association of Nigeria Annual Conference. Poster.
Garcés Molina A.M.; Berrio Roa L.; Ruíz Alzate S.; Serna de León J.S., Builes Arango A.F. 2004. *Revista Lasallista de Investigación* 1: 66-71.
Iglesias E., Escribano F., Loureiro M.L., Othman M.K., Adeosun J.O., Alao J.S., Kohn R.A. 2018. XII Congreso Iberoamericano de estudios rurales. 4-6 Julio, Segovia. Spain.
Kung L.Jr., Shaver R.D.; Grant R. J.; Schmidt R. J. 2018. *J.Dairy Sci.*, 101: 4020-4033.
Samarasinghe M. B.; Larsen M.; Johansen M.; Waldemar P.; Weisbjerg M. R. 2019. *Grass Forage Sci.*, 74: 244-253.
SAS 1999-2001. *SAS 7.0/STAT User's Guide (Release 8.2)*. SAS Inst. INC., Cary, NC.
Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. 1991. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583-3597.
WingChing-Jones R.; Leal-Rivera J.C. 2018. *UNED Research Journal*, 10: 107-114.

VALORACIÓN NUTRITIVA DE LA CAPOTA DE ALMENDRA PARA LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

Tocto, Vladimir; de Evan, Trinidad

Tutora: Carro Travieso, María Dolores

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTOR): gv.tocto@alumnos.upm.es

RESUMEN

España es el primer productor de almendra de la UE y el tercero a nivel mundial, después de EEUU y Australia. Durante la recolección y el proceso de limpieza de la almendra se generan grandes cantidades de restos, como hojas, cáscara y capota, que podrían utilizarse posteriormente. La capota de almendra es la cobertura más externa del fruto y puede utilizarse en la alimentación de los rumiantes, pero la información sobre su valor nutritivo es limitada. En este trabajo se analizó la composición química y la cinética de fermentación ruminal de ocho muestras de capota de almendra. Hubo gran variabilidad en el contenido en materia seca (40,6–92,8%), pero todas las muestras tuvieron un alto contenido en azúcares (24,3–44,3%) y fueron ampliamente fermentadas por los microorganismos ruminales. La degradabilidad ruminal de las muestras de capota de almendra fue alta, con valores similares a los de la pulpa de remolacha y de cítricos, que son dos materias primas de alta degradabilidad ruminal. Por ello la capota de almendra se podría emplear en la alimentación de los rumiantes como una fuente energética, y debido a su elevado contenido en azúcares podría aumentar la palatabilidad de la dieta.

Palabras clave: *capota de almendra, composición química, fermentación ruminal in vitro.*

INTRODUCCIÓN

El almendro es una especie con gran tradición en España y su cultivo se concentra especialmente en las zonas próximas al Mediterráneo (costeras e interiores), Andalucía y Valle del Ebro. Nuestro país destina 650.000 ha al cultivo de almendra, lo que supone el 84% de la superficie europea dedicada a este cultivo y casi un tercio de la superficie mundial (Junta de Andalucía, 2016). La almendra está formada de tres partes básicas: fruto, cascara dura y capota (CA). El fruto representa la parte comestible para el ser humano, la cáscara dura recubre el fruto y es un subproducto que puede usarse como biocombustible, y la CA es la cubierta exterior de la almendra que recubre la cáscara dura. Para la obtención del fruto se realiza un proceso de deshojado, descapotado, despellejado y despalillado, en el cual se obtienen varios subproductos (Esfahlan et al., 2010). En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de la CA en la alimentación de los rumiantes, especialmente en épocas de disponibilidad limitada de otras materias primas y forrajes (Aguilar et al., 1984). Sin embargo, la composición química y el valor nutritivo de la CA son variables y dependen, entre otros factores, de la variedad de almendra y las condiciones de cultivo (Elahi et al., 2017). El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad de ocho muestras de CA, para lo que se analizó su composición química y la cinética de producción de gas mediante incubaciones *in vitro* con líquido ruminal de ovejas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el trabajo se utilizaron ocho muestras de CA obtenidas en diferentes explotaciones agrícolas de España y Portugal usando un vibrador autopropulsado (buggy), así como dos materias primas de uso habitual en la alimentación del ganado ovino (pulpa de

remolacha y pulpa de naranja deshidratada) que se usaron como estándares de referencia. Las muestras de CA se recogieron en el campo entre el 13 de agosto y el 18 de septiembre de 2019 y se empaquetaron en bolsas de plástico, que fueron cerradas herméticamente y congeladas para su envío al laboratorio. Posteriormente, se secaron a 40°C durante 72 h y se molieron usando una malla de 1 mm de paso para efectuar el análisis de su composición química y posterior fermentación *in vitro*. La composición química se determinó según los procedimientos oficiales de la AOAC (2005).

El líquido ruminal para las incubaciones *in vitro* se obtuvo de cuatro ovejas fistuladas en el rumen y se mezcló con el medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970) en relación 1:4. Se pesaron 200 mg de materia seca (MS) de cada muestra en viales de vidrio de 60 ml, a los que se añadieron 20 ml de la mezcla de líquido ruminal y medio de cultivo usando una bomba peristáltica Watson-Marlow 520UIP31 (Watson-Marlow Fluid Technology Group, Barcelona, España). El procedimiento se repitió con el inóculo de cada oveja por separado. Los viales se cerraron con tapones de caucho y se incubaron a 39°C durante 120 horas. Se midió la producción de gas a las 2, 4, 6, 9, 12, 24, 30, 35, 48, 54, 72, 96 y 120 horas usando un manómetro y una jeringa de plástico. Además, se incubaron viales sin muestra (blancos) para restar a la cantidad de gas producida el gas endógeno, es decir el gas originado en la fermentación del inóculo ruminal de cada oveja. Los datos de producción de gas se ajustaron al modelo matemático exponencial:

$$Y = PPG \times (1 - e^{-c \times (t - Lag)})$$

en el que Y es la producción de gas medida a un tiempo t, PPG representa la producción potencial de gas, c es el ritmo fraccional de producción de gas, Lag es el tiempo necesario para que comience la producción de gas y t es el tiempo de medida. Además, se midió la degradabilidad potencial de la materia seca (DPMS₁₂₀), incubando por duplicado muestras de cada dieta en el incubador Daisy II (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, EEUU) durante 120 h. Con estos valores se calculó la degradabilidad efectiva de la MS para tiempo de retención de la digesta en el rumen de 24 h, que representa el observado en animales en un nivel medio de producción. Las relaciones entre la composición química de las muestras y los parámetros de producción de gas se estudiaron mediante análisis de correlación usando el PROC CORR del paquete estadístico SAS. El nivel de significación estadística se estableció en p<0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la composición química de las muestras de CA y de las pulpas de remolacha y cítricos. Los valores de composición química de la CA estuvieron dentro del rango señalado por otros autores (Aguilar et al., 1984; Feedipedia, 2012; Asmus, 2015). Existieron grandes diferencias numéricas entre muestras en el contenido en MS (40,6 – 92,8%), posiblemente debidas a que durante la recogida de la almendra algunas muestras se dejaron secar en el campo antes de ser recogidas. También fueron variables los contenidos en cenizas (5,14 – 13,3%) y proteína bruta (4,78 – 13,1%). El resto de fracciones presentaron menos variabilidad y todas las muestras de CA tuvieron un alto contenido en azúcares (24,3 – 44,3%), que fue superior al de las pulpas de remolacha y de cítricos. Por ello, la CA sería una buena fuente de energía rápidamente disponible para los rumiantes, ya que los azúcares se degradan muy rápidamente en el rumen. Además, la CA contiene menor cantidad de fibra neutro detergente que la pulpa de remolacha, aunque más lignificada.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de la cinética de producción gas de las muestras analizadas. La cantidad de gas generada es proporcional a la cantidad de materia orgánica degradada. La producción potencial de gas (PPG) de las muestras de CA fue menor que la de las pulpas de remolacha y de cítricos, y también se redujo el tiempo hasta que comenzó la producción de gas (Lag), lo que podría deberse al elevado contenido en azúcares de la CA, ya que los azúcares se fermentan muy rápidamente.

Tabla 1. Variedad, origen y composición química de las muestras de capota de almendra (ca) y composición química de la pulpa de remolacha y pulpa de cítricos¹

Muestra	Variedad	Origen	MS	Cenizas	PB	EE	FND	FAD	LIG	Azúcares
CA1	Guara	POR	48,1	8,70	6,05	4,77	34,1	25,8	12,4	36,2
CA2	Guara	ESP	74,0	9,04	4,78	3,10	33,1	24,5	11,2	31,9
CA3	Soleta	POR	90,2	5,14	5,11	4,69	28,1	20,1	7,24	44,3
CA4	Soleta	ESP	40,8	12,2	8,37	3,03	27,6	19,7	7,79	37,3
CA5	Belona	POR	40,6	8,67	6,23	5,60	34,2	28,1	14,6	35,2
CA6	Lauranne	POR	53,0	8,91	6,36	6,10	31,9	23,2	8,27	36,7
CA7	Penta	POR	92,8	13,3	13,1	4,70	27,4	19,3	7,25	29,4
CA8	Marta	POR	41,9	12,9	9,56	4,77	34,7	25,9	12,4	24,3
Materias primas										
	Pulpa de remolacha		89,1	5,10	9,44	0,80	48,0	24,2	2,16	4,80
	Pulpa de cítricos		91,9	4,62	7,73	4,65	31,3	15,3	0,30	22,6

¹ POR: Portugal; ESP: España; MS: materia seca; PB: proteína bruta; EE: extracto etéreo; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LIG: lignina. Los valores de composición química están expresados en porcentaje de la materia seca, excepto el contenido en materia seca.

Los resultados indican que la CA tiene una degradabilidad potencial (DPMS₁₂₀) alta, con valores similares a los de las pulpas de remolacha y cítricos, y que su DEMS es intermedia entre la de las dos pulpas. Los valores de DEMS son similares a los observados por Elahi et al. (2017), quienes obtuvieron valores de 50,7% y 60,5% para CA frescas y secas, respectivamente.

Tabla 2. Parámetros de la cinética de producción de gas de muestras de capota de almendra, pulpa de remolacha y pulpa de cítricos¹

Muestra	Variedad	Origen	PPG (ml/g)	c (h)	Lag (h)	DPMS ₁₂₀ (%)	DEMS (%)
CA1	Guara	POR	205	7,06	0,07	84,4	53,4
CA2	Guara	ESP	199	7,02	0,18	86,8	54,3
CA3	Soleta	POR	236	7,20	0,30	90,2	56,2
CA4	Soleta	ESP	225	7,88	0,12	90,3	59,0
CA5	Belona	POR	202	7,75	0,15	85,1	55,1
CA6	Lauranne	POR	243	7,17	0,16	86,8	54,6
CA7	Penta	POR	218	6,66	0,21	91,2	55,5
CA8	Marta	POR	185	7,46	0,12	85,2	54,5
Materias primas							
	Pulpa de remolacha		319	7,83	2,68	88,5	47,6
	Pulpa de cítricos		327	10,8	0,54	95,1	64,9

¹ POR: Portugal; ESP: España; PPG: producción potencial de gas; c: ritmo fraccional de producción de gas; Lag: tiempo hasta que empieza la producción de gas; RMPG: ritmo medio de producción de gas; DPMS₁₂₀: degradabilidad potencial de la materia seca; DEMS: degradabilidad efectiva de la materia seca calculada para un tiempo de permanencia en el rumen de 24 h.

Los únicos parámetros de producción de gas que mostraron correlaciones significativas con la composición química de la CA fueron la PPG, la DPMS₁₂₀ y la DEMS (Tabla 3). La correlación negativa de la PPG con el contenido en lignina se debe a que la lignina es indigestible, mientras que los azúcares se degradan totalmente en el rumen generando gas y por ello mostraron una correlación positiva con la PPG. Las correlaciones negativas de la DPMS₁₂₀ con el contenido en fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina se deben a que la fibra es una fracción menos digestible que otras (p.e., proteína bruta, extracto etéreo, etc.) y la lignina es indigestible, por lo que a mayor contenido en lignina la

CA tendrá una menor degradabilidad potencial. La DEMS solo estuvo correlacionada negativamente con el contenido en fibra neutro detergente.

Tabla 3. Coeficientes de Pearson y valores de p (entre paréntesis) de las correlaciones entre la composición química y los parámetros fermentativos de muestras de capota de almendra (solo se muestran las correlaciones con $p < 0,05$)

Item ⁴	FND	FAD	Lignin	Azúcares
PPG (ml/g)			-0,786 (0,021)	0,721 (0,044)
DPMS ₁₂₀ (%)	-0,983 (<0,001)	-0,957 (< 0,001)	-0,883 (0,003)	
DEMS (%)	-0,746 (0,034)			

¹ FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; PPG: producción potencial de gas; DPMS₁₂₀: degradabilidad potencial de la materia seca; DEMS: degradabilidad efectiva de la materia seca calculada para un tiempo de permanencia en el rumen de 24 h.

CONCLUSIONES

La composición química de la capota de almendra fue variable, pero todas las muestras tuvieron un alto contenido en azúcares y fueron ampliamente fermentadas por los microorganismos ruminales. Los resultados indican que la capota de almendra se puede emplear en la alimentación de los rumiantes como una fuente energética y por su elevado contenido en azúcares podría aumentar la palatabilidad de la dieta, aunque deben confirmarse mediante pruebas in vivo.

AGRADECIMIENTOS

Las pruebas experimentales de este trabajo se enmarcan en el Proyecto de Investigación y Desarrollo "DEALMALTEA: Valoración de la capota de almendra para alimentación animal" (IDI-20191220) que cuenta con financiación del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) a cargo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Operativo Plurirregional de Crecimiento Inteligente.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar A.A.; Smith N.E.; Baldwin R.L. 1984. *J. Dairy Sci.*, 67: 97 – 103.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. (16th ed., 5th rev.), AOAC International, Rockville, MD (EE.UU.)
- Asmus, J. 2015. Disponible en: <http://www.cqfa.org/NutritionistPerspectiveonAlmondHullsasaFeed.pdf>. Último acceso: 12/03/2020.
- Elahi, M.Y., Kargar, H., Dindarlou, M.S., Kholif, A.E., Elghandour, M.M., Rojas-Hernández, S., Odongo, N.E., Salem, A. Z. 2017. *Agroforest. Syst.*, 91(4), 773-780.
- Esfahlan, A.J.; Jamei R.; Esfahlan, A.J. 2010. *Food Chemistry*, 120: 349 – 360.
- Feedipedia. 2012. Disponible en: <https://www.feedipedia.org/node/11756>. Último acceso: 12/03/2020.
- Goering, H.K.; Van Soest, P.J. 1970. *Agricultural Handbook No. 379*, Agricultural Research Service, U.S.
- Junta de Andalucía. 2016. *Secretaría General de Agricultura y Alimentación*, 37.
- Williams S.R., Deighton M.H., Jacobs, J.L., Wales, W.L. y Moate, P.J. 2014. *Proceedings of the 5th Australasian Dairy Science Symposium*, 273 – 274.

ESTUDIO BIOTECNOLÓGICO DE RESPUESTA CELULAR A DISTINTAS PROTEÍNAS VEGETALES Y ANIMALES MEDIANTE TÉCNICAS DE VIABILIDAD COMPARADA

González-Pulido, María Fernanda

Tutor: Ramírez-Castillejo, María Del Carmen

Dept. de Biotecnología-Biología Vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid
Correo electrónico (AUTORA): mariafernanda.gpulido@alumnos.upm.es

RESUMEN

El melanoma maligno es un tipo de cáncer que presenta una mayor incidencia en la población española de entre 30 y 60 años, al que se le destina gran cantidad de recursos sanitarios, sin presentar un equilibrio entre el coste y la efectividad. Estudios muestran que las células iniciadoras de tumores (o cancer stem cells, CSCs) son las responsables de esta enfermedad, ya que, al presentar diferenciación indefinida y capacidad de autorrenovación, son capaces de causar crecimiento tumoral y de resistir a los tratamientos convencionales como la quimioterapia. Además, las CSCs han sido postuladas como las responsables de la resistencia de los tumores y de la ineficacia de los tratamientos, así como de la recaída de los pacientes. En los últimos años ha surgido la necesidad de emplear la inmunoterapia, y en este trabajo se plantean los beneficios que podría tener al utilizarla en combinación con el uso del extremo carboxilo terminal de la molécula reguladora de autorrenovación PEDF (factor derivado del epitelio pigmentado), en conjunto con algunos fármacos quimioterapéuticos. El implemento de estas terapias ha demostrado la disminución de la resistencia de las CSCs a los tratamientos convencionales que se emplean hoy en día para el melanoma.

Palabras clave: *inmunoterapia, melanoma, células-iniciadoras de tumores.*

INTRODUCCION

Situación actual del melanoma

El melanoma cutáneo es el tipo de cáncer que más recursos consume actualmente en el sistema de salud público español. Según datos de la SEOM se estiman para España en el año 2020 un total de 6.179 nuevos casos de melanoma cutáneo. No obstante, en el año 2019 se tuvo una incidencia de 6.205 casos: 3.691 mujeres y 2.514 hombres; y para el año 2018 se estableció una estimación de la prevalencia (a los 5 años) de 18.181 casos, con una mortalidad de 982 casos (SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica, 2020).

Al año, cerca de 5.000 millones de euros son destinados a la lucha contra esta enfermedad, lo que supone un 10% del gasto sanitario total. Además, el 90% de estos recursos se destinan a la atención de los últimos 6 meses de vida. Más concretamente, el 46% de este presupuesto se centra en los últimos 60 días del paciente (Almazán-Fernández et al., 2009). A pesar de la financiación empleada para tal fin, no se ha demostrado un equilibrio entre coste y efectividad. Por lo tanto, se necesitan mejores tratamientos que aumenten la duración y calidad de vida del paciente (Cashin et al., 2008).

Melanoma maligno

El melanoma maligno es la proliferación neoplásica que se origina en los melanocitos de la capa basal de la epidermis. Estos melanocitos son células que producen melanina (la responsable de la pigmentación de la piel), que tiene propiedades antioxidantes que neutralizan los radicales libres producidos por el contacto de los rayos ultravioleta con las

células epidérmicas (Martínez-González, 2007). Además, tienen proyecciones dendríticas que permiten el paso de melanina a las capas superficiales de la epidermis, protegiendo a las células basales y a los queratinocitos de la radiación solar. Sin embargo, cuando los melanocitos son dañados y transformados por esta radiación, se producen mutaciones en estas células que hacen que pierda el control de su proliferación. Hay datos que apuntan a que en estas situaciones si el sistema inmune no es capaz de detectar y destruir dichas células, el melanoma maligno aparece (Melanoma - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica, 2019).

Etiología

El principal factor de riesgo es la exposición excesiva al sol y a las fuentes artificiales de ultravioleta como las cabinas bronceadoras. Asimismo, la población que tiene un mayor riesgo de contraer esta neoplasia son personas de piel clara, ojos azules o verdes y cabello rubio o pelirrojo. Además, el melanoma se da más frecuentemente en individuos entre los 30 y 60 años, sin predilección alguna por el sexo. La incidencia es similar en ambos, pero la localización suele ser distinta. En los hombres mayores aparece en tronco, cara, cuello y hombros, y en las mujeres jóvenes en miembros inferiores. Por otro lado, la herencia genética también es importante, dado que el riesgo es mayor si un familiar cercano lo ha padecido. Aproximadamente el 10% de los pacientes con melanoma han tenido algún familiar que ha desarrollado esta enfermedad (AECC: Asociación Española Contra el Cáncer, 2018).

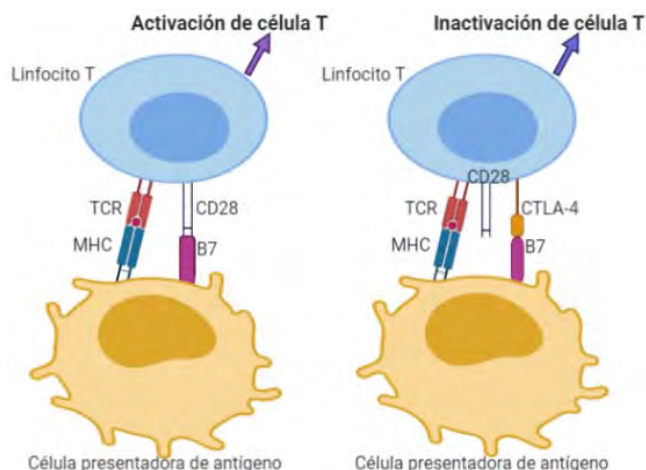
Tipos de tratamiento

Cuando el melanoma llega a un estado avanzado, es altamente resistente al tratamiento convencional de radioterapia y quimioterapia que se les aplica. Debido a la ineficacia de estos tratamientos convencionales, en el ámbito de la investigación resulta indispensable la implementación de nuevas terapias, principalmente en pacientes con melanoma en etapas III y IV (Lopez et al., 2004).

Desde la década de 1980, se comenzó a emplear la **inmunoterapia** en melanoma, cuando se logró aislar linfocitos T citotóxicos (CTL) con actividad antitumoral de sangre periférica, tejido tumoral y ganglios linfáticos de pacientes con melanoma (Molina et al., 2012). El tratamiento con inmunoterapia celular activa usa vacunas (inyectadas en el paciente vía subcutánea o intradérmica) con células tumorales autólogas irradiadas. Éstas pueden transfectarse con citocinas como IL-2 (interleucina-2), IL-7 o IL-12, de forma que presenten una función inmunitaria y se vuelvan células tumorales vulnerables a los CTL. No obstante, estos ensayos han demostrado una tasa de respuesta clínica baja en los pacientes (Sun et al., 1998). Los facultativos colaboradores del equipo de trabajo mencionan que la tasa de respuesta es variable, pero por debajo del 25-30%.

Sin embargo, otros estudios han demostrado que la capacidad de activar *in vitro* o *in vivo* los CTL específicos contra melanoma requiere de una presentación antigénica dada por las células presentadoras de antígenos (APC). En este sistema se incluyen los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas (CD). Estas últimas, tienen gran importancia en la generación de una respuesta antitumoral mediada por los linfocitos T, ya que tienen la capacidad de capturar antígenos tumorales (Lopez *et al.*, 2004). Para la activación de estos linfocitos T se necesitan dos señales. La primera es el receptor de la célula T (TCR), que reconoce al antígeno presentado por las CD mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Y la segunda señal es el *clúster of differentiation 28* (CD28) de la célula T, que produce una señal coactivadora mediante la unión a sus ligandos B7-1 o B7-2. Cuando no existe esta segunda señal, la célula T no responde al estímulo y produce una anergia. Los CTL asociados al antígeno 4 (CTLA-4) y la molécula 1 de muerte celular programada (PD-1) son dos receptores celulares de superficie que, al unirse a sus ligandos, desencadenan vías inhibitorias que moderan la actividad de las células T (Fig. 1) (Escandell et al., 2017).

Figura 1. Activación de la célula T mediante el TCR y el MHC, entre las moléculas coestimuladoras B7 y CD28 (izquierda). Inhibición de la respuesta mediante la unión del CTLA-4 a B7 (derecha).



Dado la alta incidencia del melanoma, una alternativa a la inmunoterapia es aquella que se basa en el **bloqueo de los receptores**. Esta terapia se genera por la inhibición de la respuesta inmune del tumor, ya que los anticuerpos utilizados se unen a los linfocitos para activar su respuesta. Entre los inmunomoduladores más empleados para el melanoma, se encuentra el Ipilimumab, el primer fármaco que demostró una mejor supervivencia en pacientes con melanoma metastásico. Sin embargo, su mecanismo de acción implica un gran número de efectos adversos, que en su mayoría son de tipo autoinmune (Sosman et al., 2010).

Distintos fármacos están disponibles en la actualidad para tratar el melanoma maligno (Molina et al., 2012). No obstante, otros estudios postulan que una característica común de estos inmunomoduladores es la reaparición de pseudoprogresión del tumor al introducir el fármaco. Éste es un efecto que se deriva de la activación linfocitaria y la liberación de citoquinas, que producen inflamación, edema e inclusive necrosis a nivel local, lo que provoca un aumento en el volumen de la lesión (Escandell et al., 2017).

Células iniciadoras de tumores (TICs)

También llamadas **células madre tumorales** (CTMs o CSCs), son aquellas células que pueden autorrenovarse y diferenciarse de manera indefinida, esto último es lo que les confiere la capacidad de causar crecimiento tumoral (Schatton y Frank, 2008). Dentro de las características que les proporciona esa capacidad oncogénica están la acumulación de mutaciones, la resistencia a apoptosis, proliferación indefinida y el incremento de la motilidad celular (Alcalá-Pérez et al., 2015). Es importante identificar las poblaciones de CSCs para que haya un éxito en la terapia y así evitar una recaída. Estas células se dividen de manera lenta y son esencialmente resistentes a medicamentos. Estudios muestran que posiblemente expresan los mismos marcadores que las células madre normales, o bien, pueden carecer de ellos. Durante el proceso de transformación de una célula normal a una cancerígena, estos marcadores sufren una glucosilación (Karsten y Goletz, 2013). Se han descrito tres biomarcadores de células madre que se expresan en los melanocitos; nestina, CD133 y CD166 (Alcalá-Pérez et al., 2015).

No obstante, los **tratamientos convencionales** que se utilizan no afectan por completo a las CSCs, debido a su posible estado de quiescencia. Por ello, surge el interés de desarrollar nuevos tratamientos que sean capaces de eliminar las CSCs, pues se eliminaría el tumor y se evitarían futuras recidivas (Proctor y Simeone, 2013).

Proteína reguladora de la autorrenovación: PEDF

Estudios demuestran que el PEDF, tiene efectos en la autorrenovación de las células madre (SCs) y en la progresión de tumores. Por un lado, inhibe la metástasis, la invasión, la vascularización y la proliferación tumoral y, por otro lado, induce la diferenciación celular y la apoptosis tumoral. Cabe mencionar que la estimulación que se produce en la autorrenovación de las células madre, se puede inhibir de manera competitiva mediante el extremo carboxilo terminal PEDF (CTE), provocando una disminución del número de CSCs (Ramírez-Castillejo et al., 2006). De este modo, se genera una oportunidad para que el CTE sea un modulador de las características de este conjunto de células, haciendo que las CSCs sean más sensibles a los tratamientos convencionales como la quimioterapia.

CONCLUSIONES

En la actualidad, los tratamientos convencionales aún no son capaces de evitar futuras recaídas en pacientes con melanoma. No obstante, la inmunoterapia constituye un gran avance terapéutico para esta enfermedad, ya que mediante el desarrollo de nuevas inmunoterapias se puede promover una respuesta antitumoral más eficaz. Como es el caso del CTE que, en conjunto con algunos fármacos quimioterapéuticos, puedan disminuir la resistencia de las CSCs a los tratamientos convencionales empleados para melanoma.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Carmen Ramírez Castillejo, profesora de la Universidad Politécnica de Madrid, por haberme aceptado en su laboratorio, por enseñarme diversas técnicas de cultivo celular y por todo el apoyo que me brindó. A Marta, Raquel, Adri, María y Elizabeth por su amistad y enseñanza que me dieron cada día en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- AECC: Asociación Española Contra el Cáncer. 2018. Recuperado a partir de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-piel/factores-de-riesgo> (Acceso: 18 de marzo de 2020).
- Alcalá Pérez, D., Barrera Pérez, M., Yépez, R. C., Luisa, A., Pérez, C. 2015. Rev. Cent. Dermatol. Pascua., 24(2): 47-51.
- Almazán-Fernández, F. M., Serrano-Ortega, S., Moreno-Villalonga, J. J. 2009. Actas Dermosifiliogr., 100(9): 785-791.
- Cashin, R. P., Lui, P., Machado, M., Hemels, M. E. H., Corey-lisle, P. K., Einarson, T. R. 2008. Value Health Reg Issues., 2: 259-271.
- Escandell, I., Martín, J. M., Jordá, E. 2017. Actas Dermosifiliogr., 108(8): 708-720.
- Karsten, U., Goletz, S. 2013. Springerplus., 2(1): 1-8.
- Lopez, M., Escobar, A., Alfaro, J., Fodor, M., Larrondo, M., Ferrada, C., Salazar-Onfray, F. 2004. Rev Med Chil., 132(9): 1115-1126.
- Martínez González, M. S. 2007. Recuperado a partir de <https://www.tdx.cat/handle/10803/4229#page=26> (Acceso: 18 de marzo de 2020)
- Melanoma - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. 2019. Recuperado a partir de <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/melanoma?start=1> (Acceso: 18 de marzo de 2020).
- Molina, V. L. D., Castellanos, A. P., Arias, L. F., Olivera, R. M. P. 2012. DCMQ., 10(2): 123-138.
- Proctor, E. N., Simeone, D. M. 2013. Nature., 414: 197-209.
- Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S. R., Aroca-Aguilar, J. D., Sánchez, P., Mira, H., Escribano, J., Fariñas, I. 2006. Nat. Neurosci., 9(3): 331-339.
- Schatton, T., Frank, M. H. 2008. Pigment Cell Melanoma Res., 21(1): 39-55.
- SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. 2020. Recuperado a partir de https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf (Acceso: 18 de marzo de 2020).
- Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Ph, D., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., Eertwegh, A. J. M. Van Den, Ph, D., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Ph, D., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Ph, D., Lebbé, C., ... Ph, D. 2010. N. Engl. J. Med. ., 363: 711-723.
- Sun, Y., Jurgovsky, K., Möller, P., Alijagic, S., Dorbic, T., Georgieva, J., Wittig, B., Schadendorf, D. 1998. Gene Ther., 5(4): 481-490.

CONTROL AMBIENTAL EN UNA NAVE DE 180 TERNEROS MAMONES EN CARDEÑOSA (ÁVILA)

Hernández Velayos, Daniel

Tutor: Ovejero Rubio, Ismael

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

Correo electrónico (AUTOR): daniel.hernandez.velayos@alumnos.upm.es

RESUMEN

Este trabajo forma parte de un proyecto técnico, que servirá como Trabajo Fin de Máster. El objetivo del trabajo es calcular los parámetros necesarios para el control ambiental de una nave con 180 terneros mamones en Cardeñosa (Ávila), que permitan garantizar unas condiciones ambientales adecuadas para los animales, con el fin de conseguir los mejores índices técnicos posibles. La metodología de cálculo será la propuesta por CIGR, 2002.

Con todos los cálculos efectuados, puedo concluir que las naves necesitan siete ventiladores de seis polos, de 560 mm de diámetro y caudal máximo nominal de 8.200 m³/h. En lo que respecta a la ventilación, será preciso colocar veinte nebulizadores con un diámetro de boquilla de 0,30 mm y caudal de 0,13 L/min. Además, el dimensionamiento del caballete de la cubierta deberá tener una anchura de 0,4 m.

Palabras clave: *ventilación, refrigeración evaporativa, terneros mamones*

INTRODUCCION

Para calcular los diferentes parámetros de control ambiental de un alojamiento ganadero, se debe hacer un dimensionamiento de la nave teniendo en cuenta dos condicionantes que varían en función de la especie y de la edad del animal. Estos son la superficie (1,2-2,5 m²/animal y el volumen de aire estático (15-20 m³/animal), en el caso de los terneros.

Como la nave debe albergar a 180 terneros, será necesaria una nave a dos aguas de 42 m de longitud y 15 m de luz. La altura a cumbrera será de 6,5 m y al alero, de 3,5 m.

Los cálculos de control ambiental van orientados a minimizar los efectos de las estaciones del año en la producción de los mamones. La ventilación durante la temporada de invierno va a ser únicamente natural, así como en parte de la primavera y el otoño. Sin embargo, durante el verano y en las otras estaciones con temperaturas altas, la ventilación natural por gradiente de temperatura no será suficiente para garantizar las condiciones climáticas adecuadas para los terneros.

Por todo ello, se van a realizar los cálculos relativos a ventilación, refrigeración y el dimensionamiento del caballete de la nave.

PRODUCCIÓN DE CALOR POR LOS ANIMALES

Para calcular la producción de calor por los terneros alojados en la nave, se utilizará la metodología propuesta por la *Comision Internationale du Génie Rural (CIGR, 2002)*.

Se van a considerar tres situaciones:

- **Situación 1:** En primavera, la temperatura deseable en el interior del alojamiento es de 22°C con un 65 % de Humedad Relativa (HR).
- **Situación 2:** En verano, una temperatura deseable en el interior del alojamiento sería de 27 °C.

- **Situación 3:** En una situación intermedia, que podría ser principios de mayo, la temperatura interior de la nave será de 24°C. En este momento, las necesidades de ventilación ya no podrán ser cubiertas con el efecto gradiente de temperatura y deberemos hacer uso de la ventilación dinámica.

Tabla 1. Calor producido (Φ) por 180 terneros en función de la temperatura interior de la nave (CIGR, 2002)

kW/NAVE ¹	SITUACIÓN 1: 22°C	SITUACIÓN 2: 27°C	SITUACIÓN 3: 24°C
Calor total Φ_{TOT}	73,22	71,75	34,87
Calor sensible Φ_s	44,06	33,64	27,72
Calor latente Φ_L	29,16	38,11	7,15

¹Nave de 42 m de longitud y 15 m de luz

CÁLCULO DE LOS CAUDALES DE VENTILACIÓN

Una vez elegidos los materiales de construcción, se procede a calcular la resistencia térmica de la envolvente del edificio, es decir, del cerramiento vertical, la cubierta y la solera. Los paramentos verticales están compuestos por paneles de hormigón aislados, una cortina ganadera y seis puertas.

A partir de las superficies calculadas, se calcula la transmitancia térmica (U) en función de las resistencias térmicas de las superficies de cada elemento constructivo. En la tabla 2 se muestran los resultados para cada uno de los componentes de la envolvente del edificio.

Tabla 2. Superficies (S) de cerramientos y su transmitancia térmica (U) en función de la diferencia de temperatura entre el exterior e interior de la nave

	S(m ²)	U (W/m ² K)	ΔT (K)		
			Situación 1 22°C	Situación 2 27°C	Situación 3 24°C
MURO	444	1,13	5,0	-4,8	4,0
CUBIERTA	680,4	0,72	5,0	-4,8	4,0
SOLERA	630	2,23	5,0	-4,8	4,0

Con los datos anteriores, se procede a calcular para las tres situaciones de referencia el calor que se transmite a través del cerramiento (q_c) a partir de la siguiente expresión matemática.

$$q_c = \sum S_j * U_j * (t_{int} - t_{ext})$$

Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Calor (Q_c) que se transmite a través de los cerramientos en función de la temperatura interior de la nave

SITUACIÓN	Q_c (kW)
I	11,98
II	-11,50
III	9,59

Para determinar los caudales de ventilación, se aplican las siguientes ecuaciones:

$$Q_s = \frac{v}{h_{RS} - h_{AR}} * (q_s - q_c)$$

$$Q_L = \frac{v * q_L}{h_{AS} - h_{PS}}$$

donde: v, es el volumen específico del aire interior; h_{AS} , la entalpía del aire interior; h_{PS} , la entalpía en el punto de separación; h_{AE} , la entalpía del aire que entra; q_s y q_L el calor sensible y latente producido por los animales y; Q_s y Q_L , el caudal de ventilación en función del calor sensible y latente.

Los resultados se presentan en la tabla 4. Para el dimensionamiento de los ventiladores, se tomará el valor máximo entre el caudal sensible y latente.

Tabla 4. Caudales de ventilación necesarios en función de la temperatura interior de la nave

	SITUACIÓN 1 22°C	SITUACIÓN 2 27°C	SITUACIÓN 3 24°C
Caudal sensible, m ³ /s	6,28	11,36	4,26
Caudal latente, m ³ /s	1,26	1,63	0,45
Máximo (Qs, Ql), m ³ /h	22.608	40.896	15.336

DIMENSIONAMIENTO DEL CABALLETE

La sección de caballete dependerá de la velocidad con que el aire sale por él (V, velocidad de descarga), y se calcula con la siguiente expresión:

$$V = \theta \sqrt{\frac{2 * g * \Delta h * (T_i - T_e)}{T_i}}$$

$$S = \frac{Q}{V}$$

Donde: θ , es un factor de reducción; g, la aceleración de la gravedad; Δh , diferencia de cota entre la salida y la entrada de aire; $T_i - T_e$, diferencia de temperaturas entre el interior y el exterior y; Q es el caudal de aire que sale.

Realizando los cálculos se determina que el ancho del caballete debe ser mayor de 0,37 m. Como se trata de caballetes prefabricados y las medidas son estándar, se utilizará una anchura del caballete de 40 cm.

ELECCIÓN DE VENTILADORES

Los ventiladores más adecuados para este tipo de nave son los helicoidales murales con hélice de plástico reforzado con fibra de vidrio. Todos los ventiladores serán de caudal variable con el objetivo de tener, en cualquier período del año, una ventilación adecuada y uniforme.

Es preferible utilizar ventiladores de 4 o más polos. Estos trabajarán a menor régimen y, por tanto, van a generar menor ruido. Para una mejor uniformidad del aire, se van a utilizar seis ventiladores.

Los ventiladores no se van a utilizar en invierno. Comenzarán a utilizarse cuando la temperatura del interior del alojamiento se aproxime a la considerada en la situación 3, es decir, para una temperatura exterior e interior de 20 y 24 °C, respectivamente.

Tabla 5. Datos del tipo de ventilador elegido

DIÁMETRO (mm)	Caudal máx. nominal (m ³ /h)	Caudal máx. real (m ³ /h)	Caudal mín. (m ³ /h)
560	8.200	7.400	1.110 - 1.480

Se van a utilizar 7 ventiladores de 6 polos, diámetro de 560 mm y caudal máximo nominal de 8.200 m³/h. El modelo de ventilador elegido es válido tanto para condiciones extremas de verano, como para finales de primavera y principios de otoño. No es necesario que funcionen todos los ventiladores a la vez. Se han dimensionado de manera que con que funcionen 3 de los 7, repartidos uniformemente a lo largo de la nave, sería suficiente. En cualquier caso, el control ambiental de la nave estará gobernado por los sensores de temperatura y humedad relativa, situados en la nave

REFRIGERACIÓN EVAPORATIVA

En la situación más desfavorable posible, las condiciones del aire exterior son de 31,8 °C y 20% de HR. Para esta situación y a la altitud del municipio en cuestión, la humedad es de 6,7 g de vapor de agua/kg de aire seco (as). Las condiciones del aire interior son de 23,0 °C, con una entalpía de 49,2 kJ/kg, y la humedad es de 10,2 g de vapor de agua/kg as. El caudal de ventilación en el verano es de 40.896 m³/h. El volumen específico del aire interior es de 1,0068 m³/kg de aire seco. De ahí, los 40.620 kg de as/h.

$$\Delta \text{Masa de agua} = 10,2 - 6,7 = 3,5 \frac{\text{g agua}}{\text{kg as}} = 0,0035 \frac{\text{kg agua}}{\text{kg as}}$$

$$\text{Aporte de agua por los nebulizadores} = 40.620 \frac{\text{kg as}}{\text{h}} \cdot 0,0035 \frac{\text{kg agua}}{\text{kg as}}$$

$$= 142,2 \frac{\text{L agua}}{\text{h}}$$

El nebulizador más adecuado es aquel que se aproxima más a los 142,2 L por hora que se deben aportar en la situación más desfavorable posible. Por tanto, se instalarán 20 nebulizadores situados de forma uniforme en dos líneas a lo largo de la nave. Los nebulizadores tendrán un diámetro de boquilla de 0,30 mm con un caudal de 0,13 L/min a 7.000 kPa.

CONCLUSIONES

Este trabajo muestra de forma breve la metodología aplicada para el cálculo del control ambiental en una nave que aloja a 180 terneros en el municipio de Cardeñosa (Ávila). Los principales resultados son que el ancho del caballete será de 40 cm, se instalarán 7 ventiladores de 6 polos con diámetro de 560 mm y caudal máximo nominal de 8.200 m³/h, y también, un sistema de 20 nebulizadores de alta presión con un caudal de 0,13 L/min.

AGRADECIMIENTOS

A Ismael Ovejero, por los conocimientos que me transmitió en el cálculo de control ambiental de mi proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Metodología propuesta por la Comisión Internacional du Génie Rural (CIGR, 2002)
 CIGR (2002) 4th Report of Working Group on Climatization of Animal Houses. Heat and Moisture Production at Animal and House Levels. Pedersen, S. & Sallvik, K. (eds) International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering (CIGR), Danish Institute of Agricultural Sciences, Horsens, Denmark

TALLER DE PODA DE VID: DISTINTOS MÉTODOS Y LABORES ACCESORIAS

Lacalle Olarte, Sara; Lázaro Hernández, Lucía; Carrero Victorino, Francisco Javier; Tang, Yi.

Tutora: Baeza, Pilar

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

*Correo electrónico (AUTORES): s.lacalle@alumnos.upm.es, lucia.lazaro.hernandez@alumnos.upm.es,
fj.carrero@alumnos.upm.es, yi.tang@alumnos.upm.es*

RESUMEN

La elección del método de poda, al igual que la adecuada realización de esta y las labores accesorias en un viñedo son esenciales para el correcto funcionamiento del mismo. Durante nuestra formación como ingenieros agrícolas se nos dio la oportunidad de realizar un taller de poda que explorara distintos métodos. El objetivo de ese taller y de este trabajo es exponer los distintos métodos de poda que se siguieron, e informar de algunas de las labores accesorias y los problemas derivados de no realizar una poda adecuada. Entre los métodos de poda que se practican, la poda Guyot y la poda corta en cordón bilateral fueron las que estudiamos, junto con algunas labores accesorias como el tensado de los alambres de formación en viñedos con espalderas, y el atado de las plantas con sistemas como gomas anclas. La incorrecta realización de la poda o las labores puede llevar a la disminución de rendimientos, favorecer la entrada de patógenos en la madera y dificultar la mecanización. Son problemas con un efecto a largo plazo, al ser cultivos leñosos perennes.

Palabras clave: *Vitis vinifera, poda Guyot, poda Royat.*

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino, España es el mayor exportador de vino y ocupa el tercer lugar entre los productores de vino en el mundo. Así, en el año 2018 España produjo 44,4 millones de hectolitros de los 292,3 que se produjeron a nivel mundial. Esto muestra cómo la vid, que lleva siendo parte de nuestra historia desde tiempos inmemoriales, es uno de los cultivos más importantes, no solo de España, sino del mundo entero (Federación Española del Vino, 2018; Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2020; Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019).

La poda es una actividad imprescindible para el desarrollo y producción de la vid, ya que puede tener una gran repercusión en la mejora del rendimiento y la calidad de las uvas. La poda consiste en la “eliminación de partes leñosas vivas de la planta (sarmientos, brazos, partes del tronco, partes herbáceas, etc.) con el fin de modificar el hábito de crecimiento natural de la cepa, adecuándose a las necesidades del viticultor” (Aliquó, G. et al, 2010). Hay que tener en cuenta que llevar a cabo una mala práctica de estas labores, o las labores accesorias podría llevar consigo la disminución de cosecha, mala formación de la planta y afectar al equilibrio vegeto-productivo de la planta, y con ello la calidad de la cosecha.

Durante el transcurso de nuestra formación en la asignatura “Taller de Producción de alimentos” se nos brindó la oportunidad de participar en el taller de poda de vid, lo cual afrontamos con entusiasmo debido a todos los factores que hacen que esta práctica sea tan importante en el cultivo de viñas. El objetivo de este taller fue estar en contacto directo con esta labor tan fundamental para adquirir conocimientos sobre la técnica de poda de la vid y su utilidad.

BASES DEL TALLER

Para realizar una buena poda lo primero que hay que conocer es la morfología de la vid. Para ello necesitaremos conocer sus 5 partes principales:

- Raíces: son las encargadas de anclar la planta al suelo, proporcionar agua y minerales a la vid y acumular sustancias de reserva.
- Tronco: este se encarga de dar rigidez a la vid, conducir agua y savia y almacenar sustancias de reserva.
- Brazos: estos portan los tallos del año y son los encargados de conducir nutrientes a la vegetación y al fruto.
- Sarmientos: son las ramas nuevas de cada año. Están constituidos por las yemas, las hojas, los zarcillos (un peciolo especializado para trepar) y racimos. En la fase inicial el sarmiento se denomina pámpano.
- Pulgar: es la parte del sarmiento con un número variable de yemas (lugar por donde dará lugar la brotación de nuevas pámpanas) que se dejan al podar la cepa (Anónimo, 2017).

Otro factor importante es la fecha de la poda, ya que se realiza durante dos épocas: en invierno (poda de invierno o de formación) y durante el ciclo de actividad en primavera (poda u operaciones en verde). Cada una tiene una función, pero ambas tienen una importancia muy grande. La poda de invierno se realiza cuando el estado vegetativo de la vid está parado, desde el mes de noviembre - diciembre (cuando la vid ha perdido todas las hojas), hasta que empiezan a brotar las yemas, hacia final de marzo o abril, según las zonas (Martínez, I., 2016).

Para realizar la poda y las labores accesorias son necesarios los siguientes materiales y herramientas:

- Para podar: guantes, gafas protectoras y tijeras de poda. En relación con estas últimas, hay diferentes tipos, como tijeras de poda a una mano y tijeras de poda a dos manos. También es necesario llevar un desinfectante para las heridas y el material de poda.
- Para el atado: se pueden usar diferentes materiales como los macarrones, gomas anclas o una máquina atadora, que ata automáticamente la vid con un trozo de alambre o una tira de plástico, dejándola firme, pero sin estranglarla.

PODAS

Según las características del ambiente, la variedad de vid, el marco de plantación, y otros factores, se debe elegir la forma de poda que más se adecúe a la situación ambiental y estructura de la explotación. Entre todas las posibles podas, nosotros estudiamos las siguientes:

PODA GUYOT

La poda Guyot es un sistema de formación y poda de la vid, que permite editar y mejorar el crecimiento de plantas para satisfacer los objetivos del cultivo. Este sistema se aplica en los viñedos que producen vinos con fines comerciales, ya que mejora el rendimiento de las viñas que producen pocos racimos por yema, o bien, producen racimos muy pequeños. Para ello, se deja crecer un sarmiento largo (vara) cuyas yemas brotan y se desarrollan dando lugar a los brotes, denominados pámpanos. Estos se guían entre alambres, obteniendo como resultado final un plano o pared denominada espaldera o empalizado.

Este tipo de poda, normalmente en espaldera, consta de dos elementos: una vara o

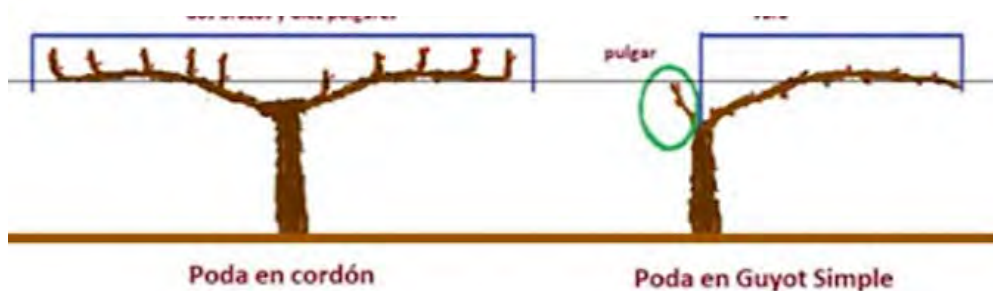
cargador que dará origen a diferentes pámpanos que acogerán los racimos, y un pulgar que se destina a la producción de madera nueva para que el año siguiente sea el cargador. Una vez identificados se procede a podar el pulgar a dos yemas vistas, y la vara entre 5 y 10 yemas, dependiendo de la variedad y la producción que se quiera obtener [Anónimo., s.f.; Tello, J., 2015; Bayo, M., 2019].

PODA CORTA EN CORDÓN BILATERAL

Esta variedad de poda es bastante popular ya que facilita la regularidad en el crecimiento de los sarmientos y en la cantidad y calidad de la cosecha. Además de esto, también favorece la mecanización de las intervenciones en el viñedo tanto de la poda como de la vendimia y el resto de las técnicas a aplicar.

En este caso, se tiene una cepa en espaldera en la que los brazos (uno sólo en la poda simple o unilateral, y dos brazos en la poda Royat) van dirigidos por el alambre de formación. La poda suele ser en pulgares y se dejan 4 ó 5 por brazo, de manera que se obtienen cordones de producción a lo largo de los cuales se sitúan los pulgares uniformemente distribuidos. Es importante no dejar mucha separación entre cepa y cepa para no dejar huecos sin vegetación, y perder así superficie foliar de producción (Bayo, M., 2019).

Figura 1. Tipos de poda.



Fuente: enolife.com.ar

LABORES ACCESORIAS

Una de las tareas complementarias de la poda en espaldera es el tensado de los alambres de formación y el atado de las plantas a estos y al tutor. El tutor es una vara que guía la planta en vertical hacia el alambre de formación, que es un alambre metálico usado para apoyar los brazos, que se formarán sobre dicho apoyo. Para realizar esta labor, se usan sistemas de agarre como gomas de ancla y macarrones. Estos permiten un agarre firme de la planta al alambre o al tutor para darle la forma deseada a la planta sin romperla ni estrangularla. Además, al ser las espalderas un sistema anclado al suelo, se evita que durante temporales o tormentas con mucho viento se rompan las plantas.

Cuando se va a realizar la poda, suele ser necesario soltar las gomas-ancla que estén sujetando las plantas, además de tensar el alambre de formación, ya que durante el año se ha podido destensar. De esta forma, los brazos de todas las plantas se encuentran a la misma altura, lo que agiliza otras labores mecanizadas.

PODAS DEFICIENTES. PROBLEMAS

Algunas de las prácticas deficientes que pudimos observar en estos sistemas de podas fueron la verticalidad del tronco y arqueados muy cerrados, entre otros. Estos errores conllevan una peor vascularización de la savia, lo cual afecta a la nutrición de la planta a largo plazo y cicatrización de heridas de poda. Todo esto debilita a la planta y puede favorecer la entrada de parásitos.

En otros casos, si no se respeta el ángulo de corte, se pueden producir quemaduras o congelación de las yemas que se encuentran debajo de la herida debido a los “lloros” de la planta. Los lloros, junto con los hongos saprófitos que se desarrollan, ayudan a cicatrizar. Si este líquido escurre por la madera hasta la yema, puede congelarla en época de heladas o quemarla con el sol y provocar que esa yema no brote. Es por eso que el corte se debe orientar con la inclinación al lado opuesto al que se encuentre la yema anterior al corte.

CONCLUSIONES

Cada viñedo, con las características climatológicas y del cultivo deseado tendrán un método de poda más adecuado. La poda Guyot consta de un pulgar y una vara (de donde saldrán las yemas), mientras que la poda bilateral forma la vid con dos brazos, donde se sitúan los pulgares. Esta elección, junto con la adecuada realización de la poda y las labores accesorias, permitirán un correcto funcionamiento del viñedo. Entre estas labores accesorias se encuentra el correcto atado (manteniendo firme la planta para evitar roturas con el viento, pero sin estrangular) y el tensado de los alambres de formación.

De realizar una poda deficiente o un mal atado, la producción se podría ver afectada, al poderse quebrar la vid por el aire, impidiendo la conducción de savia, o produciéndose heridas o quemaduras en las yemas productoras.

Por todo lo mencionado, consideramos de gran utilidad este taller en el que hemos estado en contacto directo con esta labor tan fundamental y hemos adquirido todos estos conocimientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aliquó G., Catania A., Aguado G. 2010. La poda de la vid. Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Lujan de Cuyo, Argentina.
- Federación Española del Vino. 2018. El sector en cifras. Federación Española del vino. Recuperado de <http://www.fev.es/sector-cifras/> [12:22, 16.03.2020]
- Organización Internacional de la Viña y el Vino. 2018. Estadísticas. Organización Internacional de la Viña y el Vino. Recuperado de <http://www.oiv.int/es/statistiques/recherche> [18:49, 07.03.2020]
- Anónimo. (s.f). Guyot. Recuperado de <http://www.lavid.eu/index.php/Guyot.html> [19:00, 06.03.2020]
- Anónimo. (30.03.2017). Morfología de la vid y de la uva. Recuperado de <https://labodegadesalva.wordpress.com/2017/03/30/morfologia-de-la-vid-y-de-la-uva/> [10:36, 08.03.2020]
- Organización Internacional de la Viña y el Vino. 2019. State of the vitiviniculture world market. State of the sector in 2018. Organización Internacional de la Viña y el Vino.
- Bayo, M. 2019. Guía de poda completa: Cómo y cuándo podar la vid. Bodega Nietos de Sra. María. Recuperado de <https://bodeganietosmaria.com/2019/03/20/guia-de-poda-completa-como-y-cuando-podar-la-vid/> [12:00, 08.03.2020]
- Martínez, I. 2016. ¿Cómo se poda una viña?. Recuperado de <https://www.lomejordelvinoderioja.com/saber-de-vino/noticias/201601/29/como-poda-vina-20160129085619.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F> [9:04, 08.03.2020]
- Tello, J. 2015. Poda Guyot: Sistemas de conducción en vid (III). Recuperado de <http://www.vitivinicultura.net/poda-guyot-vid.html> [12:30, 08.03.2020].

ESTUDIO DE LAS CITOQUINAS SECRETADAS POR DOS LÍNEAS DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE COLON EN COCULTIVO CON LINFOCITOS Y EN TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA Y CON EL EXTREMO C-TERMINAL DE LA PROTEÍNA PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR (PEDF)

Alfonso, Elizabeth

Tutor: Ramírez Castillejo, María del Carmen

Dept. de Biotecnología Vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTOR): e.abermejo@alumnos.upm.es

RESUMEN

El cáncer de colon es el tercer tipo de cáncer más frecuente en el mundo. El coste sanitario asociado a los tratamientos que se precisan es relevante pero más aún lo es el coste derivado de las recaídas. Las células iniciadoras de tumores (CITs o Tumor Initiating Cells, TICs) juegan un papel muy importante tanto en el inicio del proceso tumoral como en las recaídas. La proteína PEDF (Pigment epithelium-derived factor o factor derivado del epitelio pigmentado) y sus derivados han mostrado efecto en las CITs, reduciendo su número en los tejidos tumorales. El estudio de PEDF y sus derivados con el objeto de desarrollar nuevas terapias supondría un gran alivio para el gasto sanitario.

Palabras clave: *CITs, PEDF, CRC.*

INTRODUCCIÓN

La incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal lleva incrementándose desde los últimos 25 años en los adultos menores de 50 años (Ahmed, M. 2020). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2018 se diagnosticaron 1,8 millones de casos de cáncer de colon colorrectal nuevos, y 862 000 pacientes fallecieron; lo cual supone que esta dolencia es la tercera enfermedad maligna más frecuente del mundo, tan solo precedida por el cáncer de pulmón y por el cáncer de mama (International Agency for Research on Cancer. 2019).

En España, el cáncer colorrectal es el más frecuentemente diagnosticado. Si observamos la población española entre 50 y 69 años, en 2017 se detectaron 112 casos nuevos y 34 defunciones por cada 100 000 habitantes (Observatorio del Cáncer de la AECC. 2018).

Las CITs llevan años en el punto de mira debido a que muchas teorías apuntan a ellas como iniciadoras de los procesos neoplásicos, tanto de los primarios como de las recaídas. También reciben el nombre de células madre tumorales (CMTs o Cancer Stem Cells, CSCs). De hecho, la presencia de mínimas cantidades de células tumorales en pacientes que han sido intervenidos quirúrgicamente y tratados con radioterapia o quimioterapia (enfermedad mínima residual) está relacionada con las CITs (Mattiuzzi, C. 2019). Una de las hipótesis existentes al respecto postula que las células madre se encuentran en estado de quiescencia, es decir, no están en división celular, por lo que pueden acumular mutaciones y cambios epigenéticos cruciales para la iniciación y progresión del tumor de tal manera que se transforman en CMTs. Además, al igual que las células madre, las CMTs resisten a la apoptosis, a la radioterapia y a la quimioterapia (García Bueno, 2008).

Los tratamientos utilizados convencionalmente para el cáncer de colon colorrectal apenas afectan a las CMTs por su característico estado de quiescencia. Por ello, es imperativo desarrollar nuevos tratamientos encaminados a la eliminación de las CMTs ya que, además de eliminar el tumor, se evitan recaídas futuras (Reya, 2001). En ese sentido, la proteína PEDF ha demostrado tener efectos en la autorrenovación de las células madre

y, en consecuencia, en la progresión de los tumores. Por un lado, induce la diferenciación celular y la apoptosis tumoral; y por otro lado, inhibe la proliferación tumoral, la vascularización, la migración celular, la invasión y la metástasis. La estimulación que produce en la autorrenovación de las células madre se puede inhibir de forma competitiva por el dominio C-terminal de la proteína, provocando una disminución del número de células madre presentes en el cultivo (Ramírez-Castillejo, 2006)

El concepto de vigilancia inmunitaria afirma que una función fisiológica del sistema inmunitario es reconocer y destruir clones de células transformadas antes de que se conviertan en tumores y eliminar los tumores una vez se han formado.

Con respecto a la inmunidad antitumoral, es de destacar que los tumores estimulan respuestas inmunitarias adaptativas específicas; lo cual conlleva a que la respuesta inmunitaria frente a los tumores es específica, con memoria y cuenta con la participación de los linfocitos. No obstante, las respuesta inmunitaria no impiden con frecuencia el crecimiento de los tumores ya que, en primer lugar, muchos tumores presentan mecanismos para evadir estas respuestas; en segundo lugar, muchos tumores tienden a tener una capacidad inmunógena débil porque las células tumorales son similares a las células del anfitrión en muchos aspectos; y, por último, no hay que olvidar que el crecimiento rápido y la diseminación del tumor pueden superar la capacidad del sistema inmunitario de controlar de forma eficaz el tumor.

El principal mecanismo de la protección inmunitaria contra los tumores es la muerte de las células tumorales por los CTL CD8+ por el reconocimiento de antígenos tumorales que las células presentadoras de antígenos- en especial células dendríticas- ingieren, procesan y presentan a través de moléculas de la clase I del MHC. Los linfocitos CD4+ pueden participar en las respuestas inmunitarias antitumorales proporcionando citocinas para la diferenciación de los linfocitos T CD8+ vírgenes en CTL efectores y de memoria. Además, los linfocitos T cooperadores específicos frente a los antígenos tumorales pueden secretar citocinas, como el TNF y el IFN- γ , que pueden aumentar la expresión de la clase I del MHC por las células tumorales y la sensibilidad a la lisis por los CTL. El IFN- γ también puede activar a los macrófagos para que destruyan células tumorales.

Las metas de este proyecto son, por un lado, estudiar el efecto del extremo c-terminal de la proteína PEDF junto con quimioterapia sobre células madre tumorales; y por otro lado, analizar las citoquinas secretadas por la población linfocitaria en contacto con las células madre tumorales

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y células del sistema inmunitario

Para la consecución de los objetivos descritos se utilizan, en primer lugar, dos de las siguientes líneas celulares de células madre tumorales, las que mejor crezcan tras su descongelación:

- DLD-1: adenocarcinoma de colon humano de estadio C de Dukes. Es un tumor primario. Se caracteriza por su gran capacidad tumoral. Presenta una mutación en p53.
- SW-480: adenocarcinoma de colon humano. Tumor primario.
- HT-29: adenocarcinoma de colon humano. Es un tumor primario. A nivel morfológico, los cultivos son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación.

Todas las líneas celulares fueron donadas por el Laboratorio de Genética Clínica de la Facultad de Medicina de Albacete.

En segundo lugar, se emplean muestras de la fracción de células nucleadas en sangre periférica procedentes de donantes. La técnica consistió en aislar células mononucleadas (fracción enriquecida en linfocitos y células precursoras) mediante Ficoll para los análisis posteriores de cocultivo durante 5 días *in vitro*.

Cultivos celulares

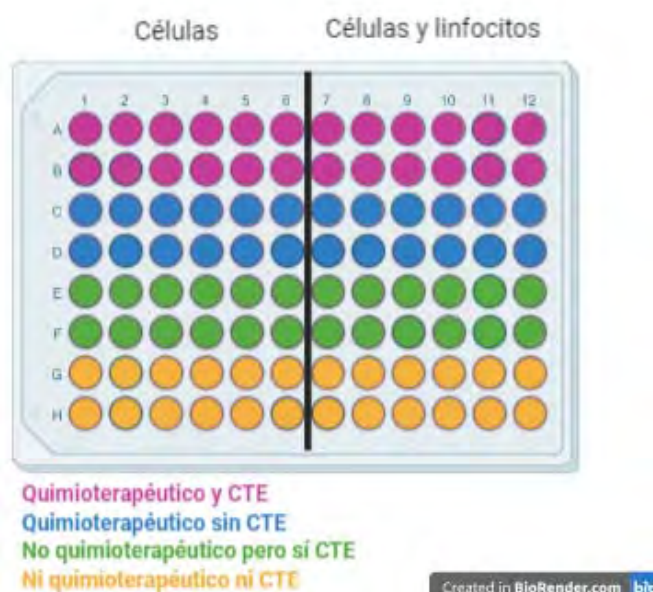
Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 4,5mg/mL de glucosa, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Fetal Bovine Serum), 1% de penicilina/estreptomicina (10 000/ 10 000 U/mL) y 1% de glutamina (200nM), en una atmósfera a 37°C y 5% de CO₂

Estas condiciones de cultivo, empleadas inicialmente para el desarrollo inicial celular se repiten para todos los experimentos posteriores.

Tratamiento con quimioterapia y CTE (extremo c-terminal de la proteína PEDF)

El diseño del experimento se realizó sobre la base de una placa de 96 pocillos distribuida de la manera indicada en la Figura 1.

Figura 1. Diseño del experimento con quimioterapia y CTE sobre una placa de 96 pocillos



Ensayos MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido.

El MTT se utiliza a 5mg/ml debido a las líneas celulares que se están empleando (Zhang y Zhang, 2019).

Inmunoensayo para la detección de citoquinas

Para la detección de las citoquinas secretadas en los cocultivos de células madre tumorales y linfocitos se utiliza Bio-Plex Multiplex Immunoassay System, un sistema que permite cuantificar más de 500 proteínas y péptidos distintos simultáneamente

CONCLUSIONES

Con la consecución de los objetivos expuestos se pretende abrir la puerta a nuevos tratamientos para el cáncer de colon colorrectal basados en inmunoterapia, ya sea en combinación o no con quimioterapia y CTE. El sistema inmune del paciente juega un importante papel en la evolución de la enfermedad de cada paciente y su respuesta a los tratamientos a los que será sometido. Por lo tanto, las aplicaciones del presente trabajo son básicamente el poder conocer como las distintas poblaciones del sistema inmune, principalmente linfocitos, macrófagos y células dendríticas, pueden modificar la secreción del patrón de citoquinas de forma que tengan un efecto sinérgico con el tratamiento antineoplásico. En segundo lugar, se espera poder aplicar los resultados aquí obtenidos a la aplicación biotecnológica de producción de CTE como complemento a los tratamientos actuales y en respuesta al avance de la enfermedad. Ambas aplicaciones pueden tener nexos comunes que se tendrán que confirmar en futuros experimentos en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M. (2020). Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology Research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.14740/gr1239>
- García Bueno, J. M., Ocaña, A., Castro-García, P., Gil Gas, C., Sánchez-Sánchez, F., Poblet, E., Serrano, R., Calero, R., & Ramírez-Castillejo, C. (2008). An update on the biology of cancer stem cells in breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 10(12), 786–793. <https://doi.org/10.1007/s12094-008-0291-9>
- International Agency for Research on Cancer. Cancer Fact Sheets. Available online: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Last access: July 4, 2019
- Mattiuzzi, C., Sanchis-Gomar, F., & Lippi, G. (2019). Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Annals of Translational Medicine*, 7(21), 609–609. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.07.91>
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9:331-339
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De MR (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445:111-115
- Zhang, Y., Zhang, S., Yin, J., & Xu, R. (2019). MiR-566 mediates cell migration and invasion in colon cancer cells by direct targeting of *PSKH1*. *Cancer cell international*, 19, 333. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1053-1>.

SESIÓN PÓSTERS

INMOVILIZACIÓN DE METALES PESADOS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ENMIENDAS EN EL SUELO CONTAMINADO DE UNA MINA ABANDONADA

Fernández, Álvaro

Mariscal-Sancho, Ignacio; Masaguer, Alberto

Dept.de Producción Agraria. Unidad de Edafología. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

Correo electrónico (AUTOR): alvaro.fernandezm@alumnos.upm.es

RESUMEN

La adición de enmiendas orgánicas y calizas puede ser aplicada para la remediación de emplazamientos contaminados con metales pesados, como la mina Antigua Pilar. La presencia de altas concentraciones de Cu y Zn puede constituir una amenaza para el entorno, por lo que la inmovilización de los metales es necesaria para la recuperación de las funciones del suelo en escombreras mineras. En este trabajo se analizaron tres enmiendas distintas sobre muestras de suelo contaminado (espuma de azucarería, compost de restos de poda y vermicompost), aplicando dos dosis diferentes para cada tratamiento, en combinación con la siembra de una especie tolerante a los metales (*Festuca rubra* L.). Se analizaron los efectos sobre varios parámetros fisicoquímicos del suelo, así como las fracciones de metales mediante extracción secuencial BCR y digestión pseudototal en agua regia. Las enmiendas provocaron un aumento sobre el pH del suelo aunque el efecto sobre la producción de biomasa vegetal no fue estadísticamente significativo. La adición de compost de restos de poda redujo la concentración de Cu en la fracción más biodisponible, el vermicompost produjo una reducción menor, y la enmienda caliza provocó el efecto contrario. En comparación con el Cu, el efecto de los tratamientos sobre el Zn fue menor. Los datos indican que el compost de restos de poda a doble dosis es el tratamiento más eficaz para la reducción de la disponibilidad de los metales estudiados y el inicio de la recuperación de la zona.

Palabras clave: *contaminación, enmienda, metales pesados*

INTRODUCCIÓN

La conservación del suelo es esencial para el desarrollo socioeconómico y el sostenimiento de los ecosistemas terrestres, sin embargo, la mala gestión de actividades humanas como la minería puede provocar su degradación mediante la liberación de sustancias contaminantes en altas concentraciones, como son los metales pesados. Elementos como Cu y Zn pueden encontrarse de manera natural en el suelo, sin embargo, una concentración excesiva puede suponer un riesgo para el desarrollo vegetal mediante la inhibición del crecimiento radicular y la síntesis de clorofila, reduciendo la actividad fotosintética (Ginocchio y Narváez, 2002), con el consecuente efecto sobre el ecosistema edáfico. Este problema es propio de escombreras como la de la mina Antigua Pilar, en la Comunidad de Madrid, explotada históricamente para la extracción de calcopirita y abandonada a principios del siglo XX (Jordá, 2008).

El objetivo general de este trabajo consiste en determinar un método adecuado para la recuperación del suelo contaminado de la mina Antigua Pilar, situada en Colmenarejo, esto implica la disminución de los efectos de la contaminación para aproximarse así al estado original de la zona antes de la actividad minera, basándose en el entorno natural actual. Para ello, es necesario analizar la movilidad de los contaminantes y proponer intervenciones en la escombrera, orientadas a prevenir la incorporación de metales pesados a la cadena trófica y su transporte aguas abajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio consiste en la aplicación de distintas enmiendas en varias cantidades, seguida de la siembra de una gramínea resistente a la contaminación y con capacidad de retener los metales pesados e iniciar una posible revegetación de la zona. Dado que el riesgo

ambiental depende de la forma química de los elementos, se pone un especial énfasis en la extracción secuencial de Cu y Zn para determinar su biodisponibilidad y movilidad, y así poder diagnosticar la contaminación antes y después de los tratamientos.

Toma de muestras: El muestreo se realizó en el pie de la escombrera de la mina Antigua Pilar (Colmenarejo), donde se extrajo suelo de tres puntos distintos con características similares a 10 cm de profundidad, obteniendo 38 kg de suelo para el estudio. Los elementos gruesos se separaron en campo con un tamiz de 1 cm de malla y las muestras se secaron al aire en el laboratorio, siendo después tamizadas con una rejilla de 2 mm. Los análisis de caracterización del suelo se realizaron sobre tres muestras homogeneizadas procedentes de sendos puntos de muestreo.

Selección de enmiendas y diseño experimental: Se emplearon tres tipos de tratamiento: una enmienda caliza, la espuma de azucarería (Ca) y dos enmiendas orgánicas; compost de restos de poda (Po) y vermicompost (Ve). La espuma de azucarería, compuesta por un 76,5 % de CaCO_3 , se obtiene como subproducto de la producción de azúcar a partir de la remolacha azucarera. El compost de restos de poda empleado proviene de la Planta de Compostaje de Migas Calientes, a partir de residuos vegetales de Madrid, con un 27 % de materia orgánica y un $\text{pH} = 7,91$. La segunda enmienda orgánica es un vermicompost comercial procedente de estiércol vacuno, con un 77 % de materia orgánica y un $\text{pH} = 8,4$. Los materiales empleados son compatibles con los principios de la economía circular.

En el caso de las enmiendas orgánicas, se calculó la dosis para obtener un 2,5 % de materia orgánica, mientras que, en la espuma de azucarería, la dosis se dimensionó para alcanzar un pH de 7. Se estudió además el efecto de doblar la dosis, por lo que se aplicaron dos dosis diferentes de cada enmienda (A y B), resultando en seis tratamientos distintos (**CaA** [2,06 g], **CaB** [4,13 g], **PoA** [30,36 g], **PoB** [60,72 g], **VeA** [16,41 g], **VeB** [32,82 g]), además de un suelo de control (**C**). Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, por lo que se analizaron un total de $7 \times 4 = 28$ muestras de suelo en macetas de 1 L, dispuestas en cuatro bloques con distribución al azar. Se aplicó un riego tres días a la semana durante un período de cuatro semanas, manteniendo las muestras a capacidad de campo. Posteriormente, se sembró *Festuca rubra* y se regó a capacidad de campo durante 50 días, 3 veces por semana, en los que se realizaron conteos periódicos de las plantas. Transcurrido el período, se extrajeron las plantas, se midió la biomasa total en peso fresco, se analizó el pH , la humedad y la conductividad eléctrica y se evaluó la movilidad de los metales en base a la concentración de metales en cada fracción del suelo.

Determinaciones analíticas: El pH y la conductividad eléctrica se determinaron en extracto suelo: agua 1:2,5, la textura se obtuvo a partir del método del densímetro de Bouyoucos y para el porcentaje de carbono se empleó el método Walkley-Black (Andrades et al., 2015). Se realizó una extracción secuencial de Cu y Zn mediante el método BCR (González et al., 2009), obteniendo la concentración de la fracción soluble y asociada a carbonatos (*Extracción 1*, con ácido acético), la fracción asociada a óxidos y oxihidróxidos de Fe y Mn (*Extracción 2*, con clorhidrato de hidroxilamina) y la fracción ligada a la materia orgánica (*Extracción 3*, con acetato de amonio). El contenido pseudototal de metales en el suelo se obtuvo mediante digestión con agua regia (González et al., 2009). El análisis de la concentración de metales se realizó por espectroscopía de absorción atómica. Para comparar las medias de los parámetros estudiados en función del tratamiento, se empleó la prueba LSD (p -valor $< 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las enmiendas provocaron un claro aumento del pH en el suelo en comparación con el suelo de control (Tabla 1). Como es de esperar, la enmienda caliza de espuma azucarera produjo el mayor aumento sobre el pH , seguida del vermicompost y el compost de restos de poda, cuyos valores permanecieron por debajo de 7. Del mismo modo, el compost de restos de poda presenta una menor conductividad y una mayor retención de humedad en

la dosis doble. Al contrario que en el resto de los parámetros, en el caso de la biomasa producida no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto, se deduce que las enmiendas no produjeron un efecto observable sobre el crecimiento vegetal a corto plazo.

Tabla 1. pH, conductividad eléctrica, humedad del suelo y rendimiento de la biomasa vegetal tras la aplicación de los tratamientos en los suelos de mina

Tratamiento	pH	CE (mS/cm)	Humedad (%)	Rendimiento (g/m ²)
C	5,55 a	366,8 ab	2,00 a	7,038 a
CaA	7,64 d	431,5 bc	1,78 a	6,168 a
CaB	7,86 e	412,6 bc	1,87 a	6,128 a
PoA	6,87 b	301,9 a	2,12 ab	6,033 a
PoB	6,93 b	353,0 ab	3,05 bc	5,460 a
VeA	7,43 c	446,1 c	3,32 c	6,185 a
VeB	7,41 c	730,7 d	1,68 a	7,395 a

Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos conforme al test LSD ($p < 0,05$).
C = Control, Ca = espuma azucarera, Po = Compost de restos de poda, Ve = Vermicompost. A = dosis baja, B = dosis doble.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de Cu y Zn obtenidas en la extracción secuencial y en la digestión pseudototal en agua regia. Tanto el vermicompost como el compost vegetal disminuyeron la concentración de Cu en fase soluble y carbonatada (Extracción 1), es decir, la forma más disponible para la planta y susceptible al transporte por lavado. El tratamiento más eficaz para reducir esta fracción fue el compost de restos de poda (PoA y PoB), alcanzando en PoB una concentración de Cu casi 10 veces menor que en el suelo de control. Para ambas enmiendas orgánicas (Po y Ve), el hecho de doblar la dosis de aplicación redujo la concentración de Cu disponible. En el caso de la enmienda caliza (CaA y CaB), la concentración de Cu en esta fracción fue mayor con respecto al suelo de control, posiblemente debido al elevado aumento de pH. Aunque los metales pesados tienden a ser más disponibles a pH ácido (Galán y Romero, 2008), un aumento excesivo de pH puede provocar un efecto similar (Kabata-Pendias, 2001), como se observa en la enmienda caliza, que provocó un aumento en la concentración de Cu en la fracción más disponible.

Tabla 2. Fraccionamiento del cobre y el zinc

Tratamiento	Extracción 1 (mg/kg)		Extracción 2 (mg/kg)		Extracción 3 (mg/kg)		Pseudototal (mg/kg)	
	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn
C	50,24 d	7,25 a	154,18 c	14,87 ab	339,05 a	26,57 a	957,65 bc	296,84 c
CaA	60,25 e	6,59 a	162,04 c	16,55 bc	398,65 abc	26,43 a	969,90 c	292,37 c
CaB	65,32 e	7,70 a	153,61 c	14,51 ab	460,29 c	29,46 a	867,26 a	257,75 ab
PoA	17,85 b	7,06 a	94,01 b	13,67 a	427,26 bc	27,64 a	886,20 ab	269,18 ab
PoB	5,31 a	7,96 a	67,39 a	17,73 c	398,74 abc	28,31 a	832,47 a	251,51 a
VeA	45,96 d	9,64 b	139,77 c	16,26 abc	394,87 ab	28,10 a	853,43 a	264,13 ab
VeB	32,85 c	11,56 c	144,85 c	17,06 bc	424,15 bc	29,49 a	865,58 a	273,01 b

Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos conforme al test LSD ($p < 0,05$).
C = Control, Ca = espuma azucarera, Po = Compost de restos de poda, Ve = Vermicompost. A = dosis baja, B = dosis doble.

Del mismo modo, para la fracción asociada a óxidos y oxihidróxidos (Extracción 2), la menor concentración se corresponde con el compost de restos de poda. En el caso de la enmienda caliza y el vermicompost, la diferencia con respecto al suelo de control no es significativa. Los valores más altos corresponden al suelo de control y la espuma azucarera. La fracción asociada a la materia orgánica (Extracción 3) es mínima para el

suelo de control. Los efectos del compost de restos de poda sobre el Cu son similares a los obtenidos por Pérez-Esteban et al. (2013) en un experimento similar con suelos mineros de la Comunidad de Madrid tratados con enmiendas orgánicas, reduciendo significativamente la concentración en las fracciones más biodisponibles.

En el caso de la extracción 1 de Zn, los tratamientos de vermicompost produjeron una concentración significativamente mayor de Zn en comparación al resto de tratamientos, lo que puede deberse al aumento de conductividad, ya que la salinidad elevada es uno de los factores que incrementan la movilidad de metales (Galán y Romero, 2008). Esta concentración es máxima para el vermicompost a la dosis doble (VeB). Estos resultados contrastan con la hipótesis de que las enmiendas orgánicas reducirían la fracción soluble de Zn, como ocurrió en el caso del Cu, sin embargo, al presentar una mayor afinidad hacia la materia orgánica, es posible que el Cu haya sustituido al Zn en la formación complejos (Reichman, 2002), lo que podría explicar también por qué ninguno de los tratamientos afectó de manera significativa a la fracción de Zn ligada a la materia orgánica (Extracción 3).

Dado que el objetivo principal de la aplicación de las enmiendas es la inmovilización de los contaminantes, el principal foco del estudio es la Extracción 1, en la que se obtiene la concentración de metales en fase soluble. Otro parámetro importante es el pH, ya que para cada metal existe un rango de valores en los que su solubilidad aumenta o disminuye, sin embargo, en el caso del Cu, el factor más determinante para su disponibilidad es la cantidad de materia orgánica, debido a su alta afinidad hacia la formación de complejos (Reichman, 2002). Por este motivo, las enmiendas orgánicas han mostrado una mayor eficacia al disminuir la concentración de Cu en fase soluble, en comparación con la enmienda caliza. Tanto el vermicompost como la enmienda caliza produjeron un aumento acusado del pH por encima de 7, lo que podría ser razón de por qué el Cu soluble no se redujo tanto como con el compost de restos de poda.

CONCLUSIONES

A partir de los datos, se deduce que el compost de restos de poda (PoA y PoB) es el tratamiento más favorable para la posible recuperación del emplazamiento contaminado, debido a la baja concentración de Cu en la fracción soluble y carbonatada de las muestras tratadas con esta enmienda, lo que prevendría el transporte de la contaminación y la incorporación de metales pesados a la cadena trófica. Este efecto es mayor al aumentar la dosis. Sin embargo, un estudio a largo plazo sobre distintas dosis permitiría obtener datos precisos sobre el desarrollo vegetal, facilitando la toma de decisiones para recuperar el emplazamiento contaminado.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Ignacio Mariscal y Alberto Masaguer, por su apoyo y contribución a mi formación académica, y a todas las personas que me han acompañado estos meses de trabajo, brindándome una ayuda indispensable.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrades M., Moliner A., Masaguer A. 2015. Editorial. Universidad de la Rioja. pp: 39-46 61-64 25-34
González D., Almendros A., Álvarez J. 2009. An. Quim., 105: 206-212
Galán E., Romero A. 2008. Macla, 10: 48-60
Ginocchio R., Narváez J. 2002. Rev. Chil. 75: 603-612
Jordá, L. 2008. Universidad Politécnica de Madrid
Kabata-Pendias, A. 2001. Editorial. CRC Press. p. 34
Pérez-Esteban J., Escolástico C., Ruiz-Fernández J., Masaguer A. Moliner, A. (2013). Environ. Exp. Bot., 88: 53-59
Reichman S. 2002. Editorial. Australian Mineral & Energy Environment Foundation.

ESTUDIO DEL CONSORCIO FUSARIA ASOCIADO A LA PODREDUMBRE VASCULAR DEL ESPÁRRAGO EN EL MUNICIPIO DE ARANJUEZ

Mero Vera, Cynthia Patricia; Brizuela, Alexandri
Tutor: Palmero Llamas, Daniel

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid
Correo electrónico (AUTORES): *cynthia.mvera@alumnos.upm.es*, *alexandri.brizuela@alumnos.upm.es*

RESUMEN

La podredumbre vascular del espárrago es una de las enfermedades más limitantes para el cultivo que se expresa principalmente en la replantación en parcelas previamente ocupadas por el mismo cultivo. El trabajo que se presenta abarca el estudio de la microbiota fúsarica del suelo y de la microbiota asociada a las raíces de las plantas de espárrago procedentes de un ensayo de replantación, en una parcela con más de 7 años de historia de cultivo llevado a cabo en Aranjuez (Madrid). Los resultados experimentales han permitido identificar mediante técnicas de aislamiento microbiológico y posterior caracterización morfológica y molecular las diferentes especies de *Fusarium*. Asimismo, se determinó la especie que presentan un mayor grado de afectación en las plantas y suelos del ensayo y su posible relación con el síndrome del decaimiento del espárrago.

Palabras clave: *Asparagus officinalis*, fusariosis, decaimiento lento.

INTRODUCCION

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una planta herbácea de la familia *Liliaceae*. Su vida productiva es de 7 a 8 años, se cultiva mediante cortes sucesivos, cuando los turiones alcanzan una altura de 10 a 12 cm de alto. España es uno de los cinco principales países productores a nivel mundial, según datos de Food and Agriculture Organization (FAO) del año 2018 (FAO, 2018). Además, las exportaciones de espárrago ascendieron a 24.701 toneladas en el año 2019, lo que supuso unos 70 millones de euros, siendo el principal productor la comunidad autónoma de Andalucía con un 69% de la producción nacional.

Por este motivo es de gran importancia conocer y estudiar las plagas y enfermedades que afectan al cultivo. Este trabajo se centra en el estudio de la microbiota fúsarica del suelo y de la microbiota asociada a las raíces de las plantas de espárrago. El Género *Fusarium*, que incluye un grupo de hongos filamentosos, causa grandes daños al cultivo ya que provoca la podredumbre de las raíces y haces vasculares, con la posterior podredumbre de la corona (Corpas-Hervias *et al.*, 2006; Block & Bowen, 1996). Ello da lugar a una acumulación de sustancias de reserva en las raíces, que son necesarias para la siguiente cosecha de turiones en la siguiente campaña, con la consecuente disminución de rendimientos del cultivo. La realización de cortes en cada cosecha provoca un daño en la planta que deja una herida por la cual se puede favorecer el ingreso de la microbiota fúsarica. Así mismo, el ingreso de hongos también puede realizarse por medio del sistema radicular pudiendo llegar al sistema vascular de la planta (Brizuela *et al.*, 2019). Este trabajo estudia la presencia y caracterización de la microbiota fúsarica tanto en el suelo como en la planta de espárrago.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de la microbiota fúsarica asociada al cultivo del espárrago se realizaron dos muestreos, uno de suelo y otro de las raíces, en un ensayo de replantación

implantado en una parcela con más de 7 años de historial de cultivo del espárrago llevado a cabo en la Finca Casa Concha (INIA) en Aranjuez.

De un total de 6 unidades de muestreo experimental para el análisis de suelos, se tomaron muestras de la parte central de cada unidad de muestreo experimental de los 20 cm superiores. Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente durante dos semanas, se homogenizaron con un mortero y se tamizaron con malla de 1 mm.

Para el recuento y aislamiento de la microbiota fúngica se empleó el medio de cultivo sólido semiselectivo Komada (Komada,1975). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se distribuyó en placas de Petri estériles a razón de 18 ml por placa.

Para el conteo de las distintas especies de *Fusarium*, se añadieron 0,04 g de suelo a 18 ml de medio de cultivo Komada en subfusión. Por cada submuestra se sembraron 3 placas. Una vez solidificado el medio de cultivo, las placas se incubaron con luz a temperatura ambiente y se contaron el número de colonias después de 5 días de incubación. Posteriormente, las colonias obtenidas se sembraron en medio PDA (Potato Dextrose Agar, Difco™) donde se realizaron cultivos monospóricos que posteriormente crecieron durante 15 días, tras lo cual se procedió a la identificación taxonómica de las distintas especies, mediante el registro del tamaño y forma de las conidias y células conidiógenas siguiendo las claves de Nelson *et al.*, (1983) y Leslie & Summerell, (2006).

La extracción de ADN se realizó a partir de los cultivos monospóricos. Para ello, el micelio de siete aislados representativos de las especies más predominantes en el inventario fúngico se raspó con un bisturí estéril, y se introdujo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml., utilizando el protocolo modificado de Queron *et al.* (1992). Se mezcló 50 µL de las enzimas líticas de *Arthrobacter luteus* (1,5 mg/mL) y lising de *Trichoderma harzianum* (2 mg/mL), con el micelio (DNA) incubando en termobloque (THERMO-SHAKER), durante 1 hora a 37 °C a 1500 rpm. El DNA se conservó a 20 °C para evitar la desnaturalización del proceso. Para la identificación de las especies de hongos se ha amplificado la región ITS (Internal transcribed spacer) del ADNr mediante la reacción en cadena polimerasa (PCR) empleando los primers ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990) y el programa de PCR mediante un termociclador Thermal Cycler TC-PRO (BOECO). Las reacciones de amplificación por PCR contenían 100 ng de DNA molde, 0,8 µM de cada uno de los cebadores, 2,5 µL de tampón 10X (20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl, 50 mM KCl; pH 9), 1 µM de MgCl₂ (50 mM), 0,2 mM de dNTPs (10 mM) y 0,03 unidades/µL polimerasa Taq (Biotaq). El volumen se completó con agua bidestilada estéril hasta 25 µL. Los primers iniciadores fueron suministrados por Metabion (España). El análisis electroforético de DNA se realizó en geles horizontales de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y 2 µL de RedSafe® (Introbion). El ADNr se observó con un transiluminador de luz ultravioleta bajo luz ultravioleta.

Para el análisis de la microbiota fúngica de las raíces, se muestrearon dos garras de cada unidad de muestreo experimental distinguiendo entre raíces de reserva con sus respectivas raíces secundarias de un tamaño aproximado de 10 a 12 cm. Las muestras de raíces se lavaron y se esterilizaron en una solución del 25% de hipoclorito de sodio durante 30 segundos y tres lavados posteriores con agua estéril durante 30 segundos. Posteriormente se dejaron secar en papel filtro estéril y se procesaron tres muestras de raíces secundarias o absorbentes y tres de primarias o de reserva por cada garra. Las raíces, de 1 cm de longitud aproximada, se colocaron en placas que contenían el medio de cultivo solidificado y se incubaron durante una semana a 25° C.

RESULTADOS

La densidad de las poblaciones de hongos en los 6 suelos analizados varió entre 100 y 27.000 ufc (unidades formadoras de colonia) /g de suelo (Figura 1).

Figura 1. Cantidad de propágulos (ufc/g de suelo) por género fúngico en las parcelas muestreadas

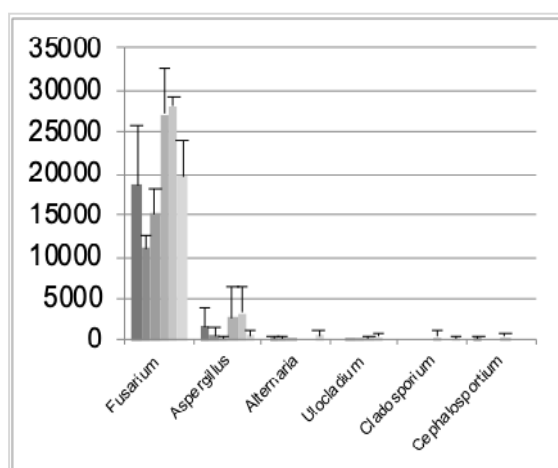
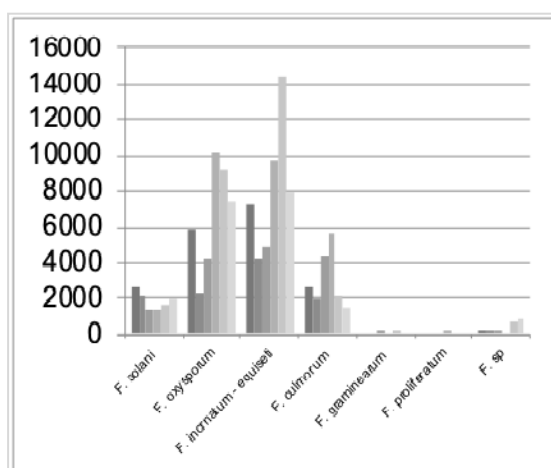


Figura 2. Cantidad de propágulos (ufc/g de suelo) de las distintas especies de *Fusarium* aisladas del suelo



El género predominante fue *Fusarium* aunque se han aislado otras especies como *Aspergillus flavus* o *A. niger*. La cantidad de propágulo del género *Fusarium* varió entre 18.000 y 27.000 ufc (ufc/g de suelo) (Figura 1). La preponderancia de aislados de *Fusarium* indica la posible relación entre el complejo fusaria y la enfermedad del síndrome de decaimiento lento del espárrago. Particularizando para el género de mayor importancia se realizaron análisis de caracterización morfológica y ensayos PCR detectándose especies tales como, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. solani*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*. De entre ellas, las más predominantes son *Fusarium incarnatum-equiseti* y *Fusarium oxysporum*, siendo *F. oxysporum* uno de los agentes causales de la enfermedad del espárrago citados en la bibliografía junto con *F. proliferatum*.

Tabla 1. Análisis de Varianza para la presencia de *Fusarium oxysporum* en las raíces del espárrago.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Tratamiento	9681.92	5	1936.38	2.16	0.068
B: Raíz (tipo)	15224.4	1	15224.4	16.98	0.0001
C: Garra	384.461	1	384.461	0.43	0.5146
Interacciones					
AB	2458.86	5	491.771	0.55	0.7388
AC	3135.82	5	627.163	0.7	0.6255
BC	1499.98	1	1499.98	1.67	0.1999
ABC	3453.43	5	690.687	0.77	0.5741
Residuos	64540.9	72	896.402		
Total (Corr.)	100380	95			

En la caracterización morfológica del sistema radicular la especie predominante es *F. oxysporum* f. sp. asparagi, si bien se han aislado, aunque en menor medida especies como *F. proliferatum* o *F. solani*. Los datos proporcionados por los análisis de las raíces muestran una menor variabilidad de las especies fúngicas asociadas. Se ha detectado también la especie *Fusarium oxysporum* como la especie predominante. Para este hongo se han realizado un análisis específico que permita analizar los factores estudiados por separado, no encontrándose diferencias significativas entre las parcelas analizadas ($p=0,068$) ni entre las diferentes plantas analizadas (garras). Sin embargo, se han detectado diferencias altamente significativas ($p=0,0001$) entre los diferentes tipos de raíz, se ha observado una mayor infección fúngica en las raíces secundarias frente a las de reserva. Siendo la raíz absorbente la que mayor porcentaje de raíces infectada con *F. oxysporum* presentaba ($52,08\pm 35,67$) frente al menor porcentaje de aislamiento presente sobre las raíces de reserva ($23,66\pm 32,22$). Estos datos podrían indicar que uno de los puntos de entrada de *F. oxysporum* en la planta podría ser a través de las raíces absorbentes.

CONCLUSIONES

El estudio de la microbiota asociada a las muestras de suelo ha permitido identificar diferentes especies de *Fusarium* asociados al decaimiento lento del espárrago. Los resultados muestran una especialización de la microbiota asociada al cultivo, con la identificación de cinco especies de *Fusarium*, de entre las que destacan *F. oxysporum* y *F. proliferatum* por su patogenicidad y relación con el síndrome del decaimiento del espárrago. En los análisis del sistema radicular de las plantas de espárrago se ha identificado con una mayor abundancia la especie *F. oxysporum*, siendo aislada predominantemente de las raíces absorbentes y en menor cantidad de las raíces de reserva. Este hecho podría arrojar luz sobre el proceso de infección al indicar que las raíces secundarias son uno de los puntos de entrada del patógeno vascular en las plantas de espárrago.

BIBLIOGRAFÍA

- Block & Bowen, 1996. Inoculum sources of *Fusarium oxysporum* f.sp. asparagi in asparagus production. *Annals of Applied Biology* 128(2):219 – 231.
- Brizuela, J.M Arroyo, J. Soler, L. Gálvez, L. López & D. Palmero (2019). Síndrome del decaimiento del espárrago en la zona norte y centro de España.
- Corpas-Hervias, C., Melero-Vara, J.M., Molinero-Ruiz, M.L., Zurera-Muñoz, C., A., & Basallote-Ureba, M. J., 2006. Characterization of Isolates of *Fusarium* spp. Obtained from Asparagus in Spain. *Plant Disease*, 90(43), 1441-1451.
- Komada, 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, 8: 114-125.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*.
- Nelson, P.E., T.A. Toussoun, and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium species: an illustration manual for identification*. 193 p. University Park, Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, USA.
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 439-446.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.

CARACTERIZACIÓN DE LA RAZA DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* CAUSANTE DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DE LA LECHUGA EN NAVARRA

Noguera, Adolfo Guillermo; Usano, María Cruz; Brizuela, Alexandri

Tutor: Palmero Llamas, Daniel

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTORES): ag.noguera@alumnos.upm.es; mariacruz.usano@upm.es;

alexandri.brizuela@alumnos.upm.es; daniel.palmero@upm.es

RESUMEN

El cultivo de la lechuga es uno de los principales cultivos hortícolas de España. La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f.sp *lactucae* es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo y para la que los tratamientos fitosanitarios resultan ineficaces. El trabajo experimental pretende caracterizar la raza fisiológica de los aislados de *Fusarium oxysporum* procedentes de muestras sintomáticas de lechuga afectadas por fusariosis vascular de la Comunidad Foral de Navarra. Se obtuvieron 10 aislados monospóricos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* sobre los que se desarrolló el trabajo experimental. En una primera fase se extrajeron el ADN y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa a partir de la región ITS con la que se confirmó la correcta extracción y viabilidad del ADN. Para identificar de qué tipo de raza de *Fusarium oxysporum* se trataba, se inocularon variedades diferenciales donadas por la empresa de semillas Rijk Zwaan y se amplificaron marcadores específicos descritos en la bibliografía. De esta manera, se pudo determinar con exactitud la raza de *Fusarium oxysporum* que afecta a las lechugas en el campo navarro, lo que a su vez permitió a los agricultores la correcta elección de material vegetal resistente como base para el control de la enfermedad en campo. La caracterización molecular y el estudio de las variedades diferenciales determinó que la raza de *F. oxysporum* de los aislados de Navarra era la raza 1, ya que los marcadores específicos amplificaron y la única variedad de lechuga afectada fue la "Banchu Red Fire" (sensible a la raza 1 y resistente a la raza 4).

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, marcadores específicos, variedades diferenciales.

INTRODUCCIÓN

La lechuga es un cultivo hortícola de alto valor añadido, que pertenece a la familia *Asteraceae*, cuyo nombre científico es *Lactuca sativa*. En el año 2019 España destinó más de 35.500 hectáreas al cultivo de la lechuga, con una producción de más de 1.016.800 toneladas (MAPAMA, 2019). Asimismo, España exportó 760.391 toneladas de lechuga, lo que supuso un circulante de 721.414.987 millones de euros. Por otro lado, la Comunidad Foral de Navarra exportó, en el año 2019, 19.034 toneladas de lechuga, siendo la quinta comunidad autónoma que mayor cantidad de lechuga exportó (FEPEX, 2019).

Por esta razón, la sanidad del cultivo de la lechuga es de vital importancia en el territorio español y navarro. Existen numerosas plagas y enfermedades que afectan a la productividad de este cultivo, entre las que destacan *Frankiniella occidentalis*, diversos pulgones, *Bremia lactucae*, *Rhizoctonia solani* o el propio *F. oxysporum* entre otros (MAPAMA, 2017). Este trabajo se centra en el estudio de la fusariosis vascular de la lechuga causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Este patógeno fue detectado por primera vez en Tokio en el año 1955 por Matuo & Motohashi (Matuo & Motohashi, 1967). A partir de allí, el patógeno se diseminó por todas las regiones productoras de lechuga causando la marchitez del cultivo. La sintomatología que presentan las lechugas afectadas comprende: el amarilleamiento de las hojas junto con el

marchitamiento del haz vascular, que comienza en la raíz primaria, mediante manchas de color parduzco o negruzco que desembocan en la muerte de la planta (Hubbard y Gerik, 1993). En la literatura se han descrito cuatro razas por lo que es indispensable conocer cuál es la raza que ataca a las lechugas de interés para poder adquirir material vegetal resistente a dicha raza (Gilardi *et al.*, 2017).

El objetivo del trabajo es el de determinar mediante marcadores moleculares e inoculaciones en variedades diferenciales la raza fisiológica de los aislados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* que están produciendo cuantiosas pérdidas de cosecha en la Comunidad Foral de Navarra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el cultivo de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* procedentes de Navarra se empleó el medio de cultivo sólido PDA (Potato Dextrose Agar, Difco TM) y la incubación se llevó a cabo durante 1 semana a 37°C. Una vez que el micelio ocupó casi la totalidad de la placa de Petri, se procedió a raspar el micelio con un bisturí estéril y se introdujo en un tubo Eppendorf para su posterior procesamiento.

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación. En cada tubo Eppendorf con el micelio se vertieron 1 ml de solución 1 junto con 50 µl de las enzimas LITICASE y LISING. Después de una incubación, el sobrenadante fue decantado y el pellet se resuspendió con 0,5 ml de solución 2, se añadieron, también, 13 µl de detergente SDS. Una vez finalizada la incubación, se añadieron 200 µl de acetato potásico 3M, se invirtieron los tubos Eppendorf. Posterior a la centrifugación, de las muestras se pipetearon 700 µl de sobrenadante y se añadieron a los nuevos tubos con 700 µl de isopropanol. Una vez centrifugadas, se decantó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de etanol al 70% frío. Se centrifugó, se decantó y se retiró el exceso de etanol con papel de filtro. Los tubos Eppendorf fueron almacenados a 37°C durante 10 minutos en la estufa hasta que el pellet se secó. Por último, se resuspendieron los pellets en 50-100 µl de agua bidestilada estéril. Las muestras se conservaron a -20°C.

Por otro lado, se llevaron a cabo reacciones en cadena de la polimerasa para observar con qué primers amplificaban las muestras de interés y, por tanto, de qué raza de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* se trataba. Se utilizaron dos pares de primers: el FOLR1 (5'-GGCTGTGTGTTGGACGGTGTAG-3') y el FOLR1-RR (5'-GCCTACCCTAAACCACACAT-3'); el Hani3' (5'CCC-TCC-AAC-ATT-CAA-CAA-CTG3') y Hanilatt3rev (5'ATT-CAC-TGT-ACA-CCA-ACC-TTTT3'); ambos son marcadores específicos para raza 1 (Fujinaga *et al.*, 2014 y Cabral *et al.*, 2014). La mezcla de reacción (25 µl) para las reacciones de PCR contenía 100 µg de ADN molde, 2'5 µl tampón 10X, 1 µl MgCl₂ a 50 mM, 0'8 µl primers *forward* y *reverse*, 0'2 µl dNTPs a 10 mM, 0'03 unidades/µl Taq polimerasa y los microlitros de agua bidestilada estériles correspondientes para llegar a los 25 µl, además de un control negativo sin ADN y un control positivo con una cantidad conocida de ADN.

Los fragmentos de ADN se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en tampón TAE empleando como agente intercalante RedSafe® al 5% (Ecogen). Las muestras se mezclaron con un 20% de azul de metilo. El ADN se observó mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Las variedades diferenciales de lechuga utilizadas en los ensayos de inoculación fueron: "Romabella" (resistente a raza 1 y 2), "Costa Rica" (resistente a raza 1) y "Banchu Red Fire" (resistente a raza 2 y 4). Las semillas fueron donadas por la empresa Rijk Zwaan.

Las semillas de lechuga (12 semillas de cada variedad) se sembraron en semilleros con turba esterilizada en el autoclave a 121°C. Las plantas se crecieron en invernadero a una temperatura de 20°C y se regaron periódicamente. Pasadas dos semanas, la mitad de las lechugas se inocularon con una concentración de 1·10⁷ unidades formadoras de colonias de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* y transcurridas 4 semanas desde la inoculación se observó la sintomatología de las variedades diferenciales.

RESULTADOS

Tras el aislamiento y extracción del DNA, la caracterización molecular realizada se compuso de la amplificación de diferentes marcadores específicos de raza. Los resultados de la caracterización molecular se recogen en la tabla que figura a continuación.

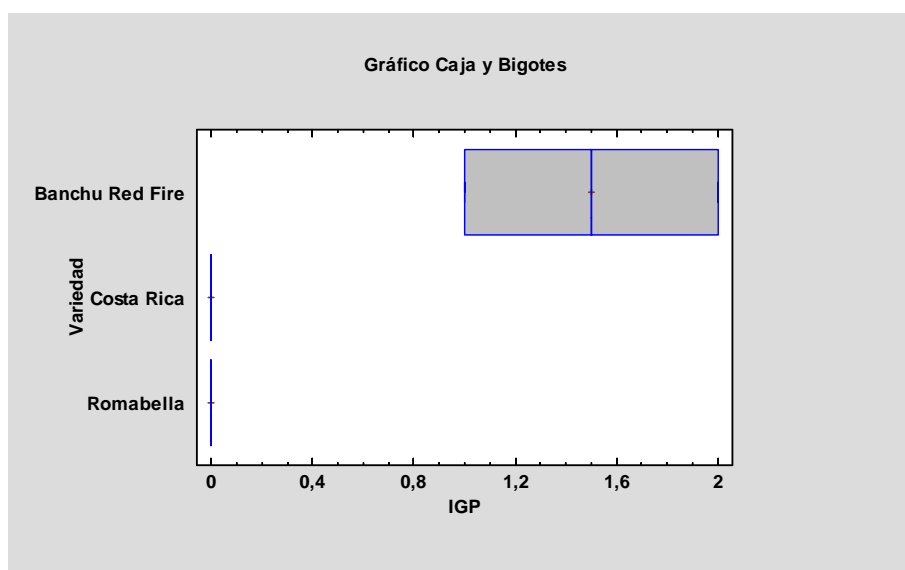
Tabla 1: caracterización molecular de los aislados de *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* con marcadores específicos de raza 1.

Aislados	FOLR1/FOLR1RR	Hani3'/Hanilatt3rev
NAV 1(3)	+	+
NAV 1(4)	Leve	+
NAV 2(1)	+	+
NAV 2(3)	Leve	+
NAV 2(4)	+	+
NAV 3(1)	Leve	+
NAV 4(4)	Leve	+
NAV 5(1)	+	+
NAV 5(2)	Leve	+
NAV 6(1)	+	+

Todos los aislados presentaron banda al correrlos en el gel de agarosa, lo que certifica que los primers hibidaron con regiones específicas de la raza fisiológica 1.

En el ensayo de patogenicidad existen diferencias significativas, $p\text{-valor}=0,0015 < 0,05$, entre las variedades. Para ilustrarlo, a continuación figura un gráfico de Caja y Bigotes donde se observa que la variedad "Banchu Red Fire" presenta diferencias significativas con las otras dos variedades, en cuanto a la infección por *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* raza 1.

Figura 1: análisis estadístico del grado de infección de las variedades diferenciales.



16 de junio de 2020

Las variedades “Romabella” y “Costa Rica” no presentaron síntomas en sus haces vasculares porque son variedades resistentes a raza 1. Sin embargo, la variedad “Banchu Red Fire” presentó manchas parduzcas en el haz vascular ya que dicha variedad solo presenta resistencia a las razas 2 y 4. Por tanto, se corrobora que la raza de *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* que afectaba a las lechugas en Navarra era la raza 1.

CONCLUSIONES

La caracterización molecular ha permitido asignar a todos los aislados de *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* analizados a la raza 1.

La variedad de lechuga “Banchu Red Fire” resultó ser susceptible a *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*, agente causal de la fusariosis vascular de la lechuga. Dicha variedad es la única susceptible a la raza 1, lo que confirma los resultados de los marcadores moleculares.

Por tanto, a los agricultores se les recomienda emplear las variedades resistentes a la raza 1 de *Fusarium oxysporum* disponibles en el mercado para controlar la enfermedad en campo.

BIBLIOGRAFÍA

Cabral, C.S., Brunelli, K.R., Costa, H., Fonseca, M.E., Boiteux, L.S. & Reis, A. 2014. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 39, 197-202.

FEPEX. 2019. Exportaciones/Importaciones españolas de frutas y hortalizas.

Fujinaga, M., Yamagishi, N., Ishiyama, Y. & Yoshizawa, E. 2014. PCR-based Race Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *J-Stage*. 2014, 47-49.

Gilardi, G. et al. 2017. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathology* 66, 677-688.

Hubbard, J. C. & Gerik, J. S. 1993. A new wilt disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* forma specialis nov. *Plant Disease*. 77, 750-754.

Matuo, T & Motohashi, S. 1967. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n. f. causing root rot of lettuce. *Trans. Mycol. Soc. Japan*. 8, 13-15.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2017. Guía GIP Hortícolas de Hoja. NIPO: 013-17-081-9.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2019. Avances superficies y producciones de cultivos. NIPO: 003-19-201-6.

ENSILING INVASIVE TYPHA GRASS FOR ANIMAL FEED. AN OPPORTUNITY FOR LOCAL COMMUNITIES IN THE HADEJIA VALLEY (NIGERIA)

Staff, Ana

Tutora: Iglesias, Eva

Dept. de Economía Agraria, Estadística y Gestión de Empresas. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTORA): ana.scatillo@alumnos.upm.es

ABSTRACT

The Typha Project¹, developed in the Hadejia Valley Irrigation district at the northeast of Nigeria, is an action research project, started in 2017, whose main objective is to find sustainable solutions against the invasion of Typha grass. In particular the project aims at developing and implementing silage techniques based on Typha to provide feed for animals. This work tries to analyze the characteristics of local communities in Hadejia Valley with a special focus on their livestock activities. We use descriptive statistics to analyze results of surveys conducted and provided by Typha project. Findings from the questionnaire show that these communities live in extreme poverty and have limited access to supplies, which is why their biggest challenge during the dry season is being able to feed their animals. Despite cultural conditions, women have participated and showed interest in each of the activities undertaken. The use of the Typha grass as silage would help improve the quality of life, environmental and socioeconomic conditions of local population.

Key words: *silage, Typha grass, invasion*

INTRODUCTION

During the recent decades, *Typha spp* is a macrophyte plant that has spread at a high rate, invading canals, farmlands and wetlands in the Hadejia Valley, Nigeria. The main negative impacts of the Typha invasion are floods, increased diseases caused by mosquitos, reduction in fishing activity and crop production (Babura, Karaye, Garba, & Afar, 2016). Regarding this situation, in 2017 the Typha project was implemented with the aim of transforming this threat into an opportunity to improve the life quality of the most affected communities (Iglesias et al, 2018). In particular, Typha project is developing silage use of Typha grass for animal feeding.

The main objectives of this work are:

- To analyze the characteristics of local communities in Hadejia Valley with a special focus on their livestock activities
- To assess potential benefits from adoption of Typha silage in animal feeding

PROJECT DESCRIPTION

The Typha Project, located in the Hadejia Valley Irrigation district at the northeast of Nigeria, is an action research project, started in 2017, whose main objective is to find sustainable solutions against the invasion of Typha grass in the area, through two alternatives: produce clean energy (biogas) and improve animal feed (making silage).

We use descriptive statistics to analyze results of surveys conducted in the framework of Typha project. The data collection was made using a face to face questionnaire. The sampling process was divided into two stages. The first stage was the community selection which was carried out considering: Proximity to the Hadejia Valley Irrigation System and the invasion of canals by Typha grass and their main economic activity

(Livestock/ farming). The second one consisted in randomly selecting the respondents from a list of 2000 members of the Water Association. The sample was composed of 311 respondents, 144 women (46.30%) and 167 men (53.70%).

ANALYSIS OF RESULTS

This analysis focused mainly on characterization of households and livestock activity in the area and on the adoption of initiatives for ensiling invasive Typha grass for animals feeding.

Households' characteristics

There is a gap between the type of education to which men have access as compared to women; the 65% of woman don't reach a formal education (Figure1). These communities, as part of his culture, practice polygamy, so 45% of households have two wives.

The households sized between 6-10 members represent the 36% of the sample and has a daily income per capita 1.10 USD (Table 1), classified as extremely poverty according World Bank index (< 1.90 USD per day) (FAO, 2019). Relatively large standard deviation is maybe partially caused by the difference in households' composition; there is a tendency that as household size increases, per capita income decreases (Figure 2).

Figure 1. Type of education achieved

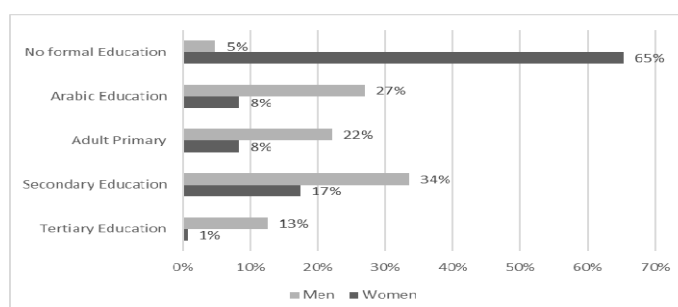


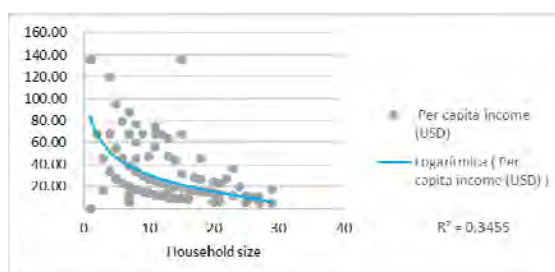
Table 1. Monthly per capita income (USD)¹

Household size	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30
Mean	57.57	33.23	30.33	16.27	16.14	9.32
SD ²	35.97	19.27	27.73	8.97	9.43	4.80

¹ 1 USD = 368.45 NGN Nigeria Naira (Consulted on March 17th)

² SD= Standard deviation

Figure 2. Distribution of monthly per capita income (USD)



An ANOVA analysis (Table 2) was conducted to compare the effect of the number of wives/one, two three or more) against the households' size. There was significant effect of the number of wives on household size at the $p < .05$ level for at least one conditions [F(3,163)= 16.53, $p = 2e-0.9^{***}$, (with a significance level > 0.999)]

Table 2. Household size - Number of wives – ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Sig.
Number of wives	3	1641	546.9	16.53	2e-09 ***
Residuals	163	5393	33.1		

Livestock

The main milk production in the area comes from cattle. Dry season has a remarkable impact reducing milk productivity by 54% (Table 3). Each household is responsible for it owns group of animals (Figure 3). The women mainly take care of the goats and sheep. The biggest impact of the dry season is that animals weight loss and feeding costs increase (Figure 4). During the dry season, offals are the main food source for animals.

Table 3. Daily milk production (liters/head)

Livestock Type	Rainy Season		Dry Season	
	Mean	Sd	Mean	Sd
Cattle	9.00	9.68	5.85	6.57
Sheep	2.37	6.46	1.52	4.00
Goats	1.18	4.09	0.62	2.82

Figure 3. Livestock responsibility

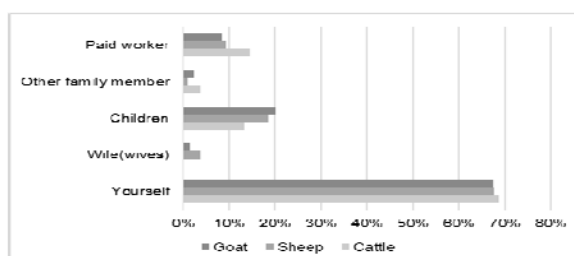
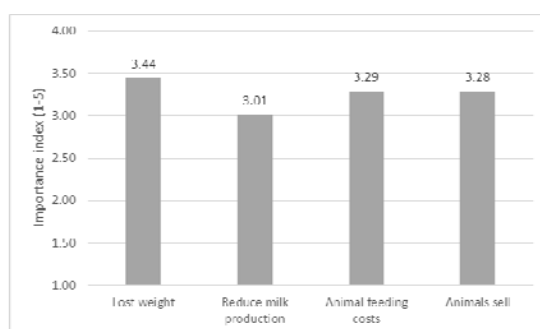


Figure 4. Perceptions on dry season impacts in the livestock activity



*Importance index: being 1 not important and 5 "very important"

Ensiling invasive *Typha* grass for animal feed

The main concern of using *Typha* silage is about learning the know-how. To solve it, workshops and demonstrations were programmed. Both activities were characterized by having a representative female attendance, considering the culture and religious traditions in the area (Figure 5). The main reason why people would start *Typha* silage would be to reduce costs and improve the growth of animals (Figure 6).

Figure 5. Attendance to workshops and demonstrations activities

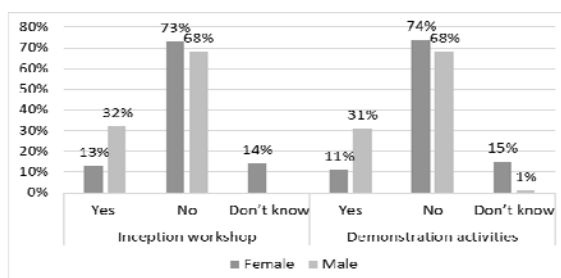
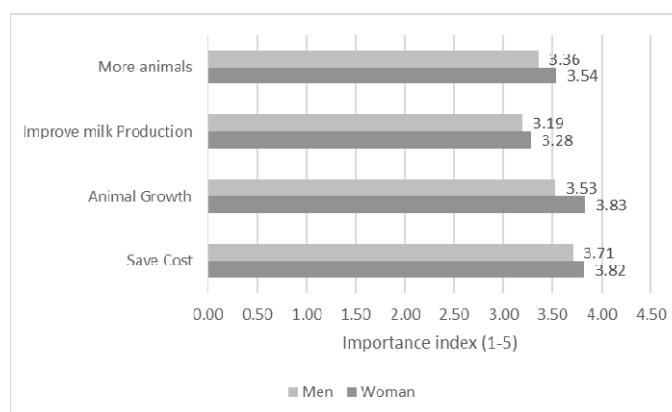


Figure 6. Main reasons why you would decide to use Typha silage



*Importance index: being 1 not important and 5 "very important"

CONCLUSIONS

Communities in the Hadejia Valley live in extreme poverty and scarcity of resources during the dry season makes it a challenge to feed their animals. According to our results, although the Typha has never been considered for feeding animals in the area, they are willing to use it and to learn how to make silage in order to reduce costs and to increase feed availability during the dry season.

It is particularly important to note that despite the cultural conditions, women have participated and showed interest in each of the activities undertaken. We conclude that adoption of the Typha as silage would help improve the quality of life, environmental and socio-economic aspect.

AGRADECIMIENTOS

Typha project research is supported by TRIMING (Transforming Irrigation Management in Nigeria), funded by the World Bank, 2017-2020, with cooperation of Universidad Politécnica de Madrid (UPM), University of Maryland (USA), National Agricultural Extension Research Liason Services (NAERLS), Nigeria and Federal University of Gashua (Nigeria).

BIBLIOGRAPHY

- Babura, Bashir, A Karaye, A Garba, and Ja Afar. 2016. «Typha Grass Militating Against Agricultural Productivity along Hadejia River, Jigawa State, Nigeria». pp:6.
- Bush, J. (2012). Hadejia Valley Mixed Economy Jigawa State. pp:16.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2019). Marco de la FAO sobre pobreza extrema rural: Hacia el logro de la meta 1.1 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible. Roma. pp:68.
- Iglesias, E., Escribano, F., Loureiro, M., Othman, M., Adeosun, J., Alao, J., & Kohn, R. (2018). Converting Aquatic Weed Invasion in Irrigation Schemes into an Opportunity to Livestock Farmers in North Eastern Nigeria. XII IBERO-AMERICAN CONGRESS OF RURAL STUDIES, Segovia, Spain. pp:6

DETERMINACIÓN DE FÓSFORO ASIMILABLE EN UN SUELO AGRÍCOLA: EXTRACCIÓN Y MEDIDA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VISIBLE

Beltrán Urías, Daniela; Rodríguez Castañeda, Arlet Ariadne

Tutores: González Rodríguez, Demetrio; García Marco, Sonia

Dept. de Química y Tecnología de Alimentos. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.
Correo electrónico (AUTORAS): daniela.beltran@alumnos.upm.es, arlet.rcastaneda@alumnos.es

RESUMEN

El fósforo (P) es un recurso crítico para la agricultura de alto valor natural, es uno de los principales impulsores de la productividad de los cultivos. El objetivo principal del siguiente estudio es la determinación de P asimilable en un suelo agrícola. Para llevar a cabo dicha determinación se realizó la extracción del P del suelo utilizando el método Olsen para suelos calcáreos o en condiciones de pH alcalino, su transformación en una especie colorimétrica que absorba radiación en la zona visible del espectro electromagnético y, su medida con una previa calibración del espectrofotómetro de absorción molecular UV-Visible. Los resultados obtenidos muestran altos valores de P asimilable en el suelo, pudiendo intervenir en los procesos de absorción de los microelementos que la planta necesita por lo que se recomienda nutrir el suelo de estos microelementos antes de la siembra.

Palabras clave: *fósforo, espectrofotometría UV-Visible, suelos agrícolas.*

INTRODUCCION

El fósforo (P) es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas y los cultivos lo requieren en cantidades relativamente grandes (Marschner, 1995). El P forma parte de compuestos orgánicos como ácidos nucleicos (ADN y ARN), fosfoproteínas, fosfolípidos, enzimas y compuestos fosfatados ricos en energía como la adenosina trifosfato (ATP). El P se mueve en la planta en forma de iones ortofosfato y como P incorporado en los compuestos orgánicos formados, además, juega un papel vital virtualmente en todos los procesos que requieren transferencia de energía en la planta (ADP, ATP).

El P se asimila por las plantas como dos moléculas inorgánicas, el H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , procedentes de la materia orgánica del suelo y/o de la fertilización. La concentración de P solubilizado de forma natural no es suficiente para cubrir la necesidad del ciclo del cultivo. Así que una parte muy importante del P asimilable sale de la reposición que producen las otras fuentes de P del suelo a la fracción soluble, en su mayoría materia orgánica. El motor de esta reposición es el desequilibrio que el cultivo produce en el suelo a través de la extracción de P. En cultivos de alto rendimiento la fertilización colabora en mantener los altos niveles de P en el suelo (Selim, 2018).

Al realizar un análisis del suelo se puede estimar la disponibilidad de P para las plantas. Se han desarrollado diferentes métodos de análisis de P, con el objetivo de conocer la disponibilidad de este nutriente y poder tomar decisiones acerca de la necesidad de fertilización del cultivo. En términos generales, las diferentes metodologías de análisis del P asimilable se basan en la utilización de extractantes químicos que solubilizan o forman complejos con los cationes que retienen al P. Tal es el caso del método Bray 1 (Bray, 1945), utilizado para suelos ácidos o algunos otros como el método Olsen (Olsen, 1954), y los métodos Mehlich 1 y Mehlich 3 (Mehlich, 1984) para condiciones básicas. También se pueden utilizar resinas de intercambio aniónico/catiónico, capaces de retener aniones (como el fosfato) y/o cationes que retienen al P (como hierro, aluminio y calcio) (Hernández, 2004).

La espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible es una técnica de análisis muy utilizada en la cuantificación de numerosas especies inorgánicas, orgánicas y bioquímicas, y como complemento en su identificación. Posiblemente sea la técnica de análisis cuantitativo más utilizada en los laboratorios de todo el mundo. Se fundamenta en relacionar la cantidad de radiación absorbida por iones o moléculas (orgánicas e inorgánicas) con la cantidad de unidades absorbentes o, lo que es igual, con su concentración. Mediante dicha técnica, se pueden determinar, además de las especies que absorben en esta zona espectral, aquellas especies que mediante una reacción química den lugar a una especie absorbente. Este es el caso de la determinación del P, mediante la formación del complejo azul formado por la reducción, con ácido ascórbico, del fosfomolibdato obtenido cuando el molibdato amónico reacciona con el P en medio ácido, en presencia del ión antimonio. El complejo formado presenta una absorbancia óptima a 880 nm. Al tratarse de una técnica instrumental se requiere de patrones P y de calibración.

Este estudio se realizó con el objetivo de llevar a cabo una determinación de P asimilable en un suelo agrícola y con estos resultados, calcular una dosificación adecuada de este nutriente al momento de cultivar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para comenzar el análisis, inicialmente se midió el pH del suelo. El procedimiento consistió en pesar 10 g de suelo en un tubo de centrifuga de 50 mL y se le añadieron 25 mL de agua destilada. Se agitó durante 10 minutos y después se dejó reposar por 30 minutos. Se procedió a medir el pH utilizando un pH-metro previamente calibrado.

Posteriormente, para la determinación del P asimilable se procedió a la obtención del extracto, se utilizó la metodología para suelos con reacción alcalina (método Olsen). Se pesaron 2,5 g de muestra de suelo secado al aire y tamizado, y se añadieron 50 mL de NaOH en un tubo de centrifuga de 50 mL. Se agitó el tubo durante media hora en un agitador. Se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm y se filtró la suspensión a través de un papel de filtro Whatman número 40.

Para realizar la curva patrón se diluyeron 100 mg de un patrón comercial de 100 mg P/L y de este matraz se tomaron 50 mL de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL para obtener patrones de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 mg P/L.

Se disolvieron 12 g de molibdato amónico 4-hidrato en 250 mL de agua. Luego, se disolvieron 0,2908 g de tartrato antimónico potásico en 100 mL de agua. Se mezclaron estas dos disoluciones con 1 L de H₂SO₄ 5 N y se completó con agua hasta 2 litros (reactivo A).

Se disolvieron 1,056 g de ácido ascórbico en 200 mL del reactivo A, este es llamado reactivo B. Se añadieron 8 mL de éste y se completó con agua destilada hasta el enrase del matraz.

En cuanto a la preparación de las muestras se tomaron 10 mL del extracto en un vaso de precipitados de 25 mL, se añadió H₂SO₄ 1,5 M hasta obtener un pH de 5 y se agitó hasta que no se tuviera un desprendimiento de gas. Se trasvasó a un matraz aforado de 50 mL y se añadió agua destilada hasta aproximadamente 40 mL. Para medir se añadieron 8 mL del reactivo B y se completó con agua destilada hasta el enrase del matraz. La prueba se llevó a cabo por cuadruplicado y el promedio de estas repeticiones fue el que se tomó como resultado.

En este caso se ha utilizado la calibración por patrón externo – curva de calibrado que consiste en la preparación de una serie de patrones de concentración creciente y la medida de sus absorbancias. Con ello se obtiene la relación $Abs = f(C)$, generalmente de tipo lineal. La concentración de cada muestra se obtiene introduciendo en ecuación que relaciona ambos términos, la señal de cada muestra y despejando la concentración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la curva patrón realizada con concentraciones conocidas de P. Con estos datos se realizó una curva de concentraciones (Figura 1), de la cual se obtuvo la ecuación de la recta con una R^2 igual a 1. Posteriormente, se muestran los cálculos realizados para obtener el P asimilable en el suelo.

Tabla 1. Absorbancias y concentraciones para la curva patrón		Figura 1. Curva patrón de fósforo
Concentración de P (mg/L)	Absorbancia	
0	0,018	
0,2	0,126	
0,4	0,235	
0,6	0,343	
0,8	0,451	
1,0	0,560	

absorbancia de la muestra = 0,232

$$P \text{ en la muestra} = \frac{(0,232 - 0,018)}{0,5419} = 0,396 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$P_{\text{asimilable}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{0,396 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot 50 \text{ mL} \cdot 50 \text{ mL} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \left(\frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \right)}{2,53 \text{ g}}$$

$$P_{\text{asimilable}} = 39,13 \frac{\text{mg de P}}{\text{kg de suelo}}$$

A partir de una curva patrón es posible obtener la concentración de P en el suelo analizado. Para los cálculos, se consideran las diluciones y volúmenes tomados para la medición y finalmente, después de ajustar las unidades, se obtiene el resultado en mg de P/kg de suelo.

El suelo analizado tiene un pH de 7,05, siendo así un suelo neutro; la absorbancia obtenida fue 0,23 y con este valor se calculó la concentración de P: 39,13 mg P/kg de suelo con una desviación estándar de 0,021, comparando el P asimilable acorde a las referencias de un suelo franco (13-19 mg/kg) da un resultado más alto (Dalai, 1977). Este exceso interviene con la absorción de otros elementos como el hierro, el manganeso y el zinc (Olayossimi et al., 2018). Los micronutrientes participan en numerosas rutas bioquímicas de las plantas, y están presentes en muchas moléculas, algunas de las cuales son capitales para conseguir una productividad adecuada del cultivo. La falta de hierro puede llevar a la aparición de síntomas de clorosis férrica, la cual indica que la capacidad fotosintética ha sido muy afectada en la síntesis de clorofila y en la actividad de los cloroplastos (Talas et al., 2016). Con la carencia de zinc, además de síntomas

parecidos (clorosis internerviales) se pueden ver afectadas las rutas de síntesis de hormonas de regulación del crecimiento vegetal (auxinas) que pueden derivar en plantas achaparradas con entrenudos cortos (Chatterjee et al., 2018). La carencia de manganeso afecta también a la fotosíntesis y a la capacidad de asimilación de nitrógeno y formación de proteínas (Schmidt et al., 2016).

El contenido del P en el suelo puede ser variable y depende del material original, del grado de alteración del suelo y de las posibilidades de lavado del suelo (Pose & Zamuner, 2016). En este caso, el resultado obtenido se basa en las posibilidades de lavado del suelo, indicando que el suelo analizado tiene altas probabilidades de ser lavado.

CONCLUSIÓN

Se llevó a cabo la determinación de P asimilable en un suelo agrícola. El suelo analizado resultó tener valores de P asimilable superiores a los indicados por la bibliografía consultada para suelos francos (Dalai, 1977), esto indica que el suelo es débilmente lavable. Una de las consecuencias posibles con estos resultados es la intervención con la absorción de otros elementos en el suelo.

Teniendo estos resultados, se puede inferir que, dependiendo de los requerimientos del cultivo, puede no ser necesaria una fertilización con P. Sin embargo, antes de cultivar en este tipo de suelos, se recomienda proporcionar abono orgánico o aplicar fertilizantes con un contenido en micronutrientes adecuado que aseguren el correcto desarrollo del cultivo, desde las primeras fases, disminuyendo el riesgo de pérdida potencial por carencias de estos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science*, 59(1), 39-46.
- Chatterjee, S., Mukherjee, D., Sharma, S., & Choudhuri, P. 2018. MANAGING BORON AND ZINC DEFICIENCY IN VEGETABLE CROPS. *Innovative Farming*, 3(2), 72-76.
- Dalai, R. C. (1977). Soil organic phosphorus. In *Advances in agronomy*. (29), 83-117.
- Hernández, J. (2004). 1.2. Métodos para estimar la disponibilidad de fósforo en los suelos. *FERTILIZACIÓN FOSFATADA DE PASTURAS EN LA REGIÓN ESTE*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, (2), 12.
- MAPA, 1986. Métodos oficiales de análisis. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, 1, 221-285.
- Mehlich, A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Communications in soil science and plant analysis*, 15(12), 1409-1416.
- Olayossimi, A. D. E. C. H. I. N. A., Amidou, O. U. A. T. T. A. R. A., Sylvestre, A. K., Estelle, N. A. S. S. A., & Albert, Y. K. 2018. Chemical Characterization of Soil of the Agropastoral Farm B29, along a Toposequence in the Department of Aboisso Comoe Southeast of Cote D'ivoire, (1), 4.
- Olsen, S. R. 1954. *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate* (939), 6. U.S. Dept. of Agriculture.
- Pose, N. N., & Zamuner, E. C. 2016. Índice de sorción como estimador de la capacidad de retención de fósforo en suelos. *Agrociencia Uruguay*, 20(2), 86-94.
- Schmidt, S. B., Jensen, P. E., & Husted, S. 2016. Manganese deficiency in plants: the impact on photosystem II. *Trends in Plant Science*, 21(7), 622-632.
- Selim, H. M. 2018. *Phosphate in soils: interaction with micronutrients, radionuclides and heavy metals*. CRC Press (1), 19.
- Talas, Y. A. V. U. Z., Aydin, S. E. N. A. Y., Yegenoglu, E. D., & Simsek, H. 2016. Iron (Fe) and iron chlorosis in plant nutrition. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Horticulture and Landscape Architecture*, 37.

DETERMINACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES DEL ÓXIDO NITROSO EMITIDO POR UN SUELO AGRÍCOLA FERTILIZADO CON UREA

Fernández-Zarate, Franklin Hitler; Isaza-Gómez, Juan Sebastián; Gómez-Calle, María Fernanda

Tutores: García Marco, Sonia; González Rodríguez, Demetrio
Dept. de Química y Tecnología de Alimentos. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid
Correo electrónico (AUTORES): fh.fernandez@alumnos.upm.es, js.isaza@alumnos.upm.es, fernanda.gomezc@alumnos.upm

RESUMEN

El óxido nitroso (N_2O) es un gas de efecto invernadero (GEI) cuya principal fuente de emisión es el sector agrícola, a través de la fertilización nitrogenada. Diversos estudios han demostrado la efectividad de los inhibidores de la nitrificación en la reducción de emisiones de N_2O . Se realizó un estudio en laboratorio para comparar las emisiones de N_2O asociadas a la aplicación de fertilizante nitrogenado con inhibidor de la nitrificación y oligoelementos. Se empleó un diseño de bloques completos al azar donde se utilizaron 15 macetas. En cada una de esas macetas se añadió 1 kg de suelo y se sembró cebada (200 kg /ha). Una semana más tarde se aplicaron 5 tratamientos por triplicado: (1) control sin fertilización nitrogenada, (2) Urea, (3) Urea + 3,4-Dimetilpirazol fosfato (DMPP), (4) Urea + $CuSO_4$ y (5) Urea + $ZnSO_4$. Posteriormente se realizaron riegos cada 7 días. Durante un mes y dos veces en semana se tomaron muestras de gases. La aplicación de Urea + DMPP redujo las emisiones de N_2O a niveles similares a los del tratamiento control, evidenciándose una reducción significativa ($p=0,02$) de las emisiones de N_2O frente a los tratamientos de Urea, Urea + Zn y Urea + Cu. Los flujos acumulados más altos los produjo el tratamiento de Urea + Zn ($66,07 \pm 19,02$ mg N/m²), seguido de la Urea + Cu ($55,82 \pm 11,71$ mg N/m²) y la Urea sola ($50,52 \pm 14,11$ mg N/m²). En conclusión, la aplicación de Urea + DMPP redujo significativamente las emisiones de N_2O , mientras la aplicación de Zn y Cu no mostró efecto inhibitorio.

Palabras claves: óxido nitroso, inhibidores de la nitrificación, oligoelementos.

INTRODUCCIÓN

El N_2O es un gas de efecto invernadero (GEI) con un potencial de calentamiento global 298 veces superior al del dióxido de carbono (Myhre et al., 2013), responsable del agotamiento del ozono estratosférico y del 6.2% del efecto invernadero antropogénico (IPCC, 2014). Esto hace que sean necesarias nuevas estrategias de manejo de fertilizantes a fin de asegurar producciones futuras, reduciendo su impacto ambiental (Gilsanz et al., 2016). Para ello, es preciso implementar buenas prácticas agrícolas que lleven a armonizar el suministro de N con su absorción por parte de los cultivos (Vilas et al., 2019), y que están relacionadas con el manejo responsable del fertilizante (aplicar la fuente adecuada, en la dosis, momento y lugar adecuados) (Ventura et al., 2016).

Como estrategia de mitigación de emisiones de N_2O altamente efectiva se encuentra el uso de inhibidores de la nitrificación (NI), que disminuyen las pérdidas y aumentan la eficiencia del uso del N (Misselbrook et al., 2014). Los inhibidores de la nitrificación actúan desactivando la enzima responsable de la oxidación de NH_4^+ a NO_2^- (Subbarao et al., 2006). Este efecto puede durar varias semanas e incluso meses. De la diversidad de NI sintéticos que existen, solo algunos han alcanzado importancia comercial, tal es el caso del 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) (Maris et al., 2015).

La producción de N_2O se lleva a cabo a través de enzimas que contienen metales como cofactores para el transporte de electrones o como catalizadores en los centros activos (Glass y Orphan, 2012) y a pesar de su importancia, su influencia en las emisiones raramente es estudiada. En algunos trabajos se ha observado que una baja disponibilidad de Cu puede producir la inactivación de la enzima N_2O reductasa (Sullivan

et al., 2013) y que también juega un papel importante en la reducción de NO_2^- a N_2O (Enwall et al., 2010). Y en el caso del Zn, se ha observado que una alta concentración de este elemento en suelos arenosos costeros sometidos a descargas de aguas residuales puede inhibir la producción de N_2O (Huang et al., 2017).

El objetivo del presente estudio de laboratorio fue determinar mediante cromatografía de gases el N_2O emitido, y evaluar el efecto inhibitorio del proceso de nitrificación del DMPP y de metales como el Zn y el Cu en un cultivo de cebada fertilizado con Urea, bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Química y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Politécnica de Madrid, ubicada en la Avenida Puerta de Hierro, 2, 28040 Madrid. El suelo utilizado procede de la Finca Experimental "El Encín", situada en el municipio de Alcalá de Henares. Sus características físico-químicas fueron; textura: franco limo arcillosa, pH: $8,4 \pm 0,1$, CE: $0,08 \pm 0,00$ dS/m, CaCO_3 : $7,6 \pm 0,2$ %, caliza activa: $1,4 \pm 0,2$ %, P: $40,2 \pm 2,5$ mg/kg, N total: $0,1 \pm 0,0$ %, Ca: 247 ± 13 mg/100 g, K: $19,1 \pm 0,7$ mg/100 g, Na: $6,5 \pm 0,6$ mg/100 g, Mg: $21,5 \pm 0,8$ mg/100 g. Los métodos utilizados en su determinación han sido en su mayoría los Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 1994).

Diseño experimental

Se empleó un diseño de bloques completos al azar donde se utilizaron 15 macetas de 11 cm de diámetro y 19 cm de altura. En cada una de esas macetas se añadió 1 kg de suelo y se sembró cebada (dosis de siembra de 200 kg /ha, 5 plantas por tiesto). Una semana más tarde se aplicaron 5 tratamientos por triplicado: (1) control sin fertilización nitrogenada, (2) Urea, (3) Urea + DMPP, (4) Urea + CuSO_4 y (5) Urea + ZnSO_4 . Las dosis aplicadas fueron: Urea (granulada), 90 kg N/ha; CuSO_4 , 5 kg Cu/ha y ZnSO_4 , 5 kg Zn/ha ambas en disolución. Al inicio del estudio, el suelo se puso a capacidad de campo y posteriormente se realizaron riegos cada 7 días de 50 ml de agua por maceta. Una y 72 horas después del riego se tomaron muestras de gases.

Determinación de gases de efecto invernadero

Obtención de la muestra gaseosa

El muestreo de N_2O se realizó 2 veces en semana desde el 7 de febrero hasta el 4 de marzo de 2020. Para ello, se usó el método de cámaras cerradas estáticas propuesto por Rolston (1986) modificado ligeramente, que consiste en muestrear el gas procedente del suelo y encerrado en el interior de una cámara. Para este caso, las macetas se cerraron utilizando una tapa provista de una llave de tres vías. A través de ella y, con ayuda de una jeringa, se muestreó (después de homogeneizarlo) el gas acumulado inmediatamente después de cerrar la maceta (0 minutos) y 45 minutos después. El gas así recogido se introdujo dentro de un vial para su posterior determinación por cromatografía de gases. El volumen del espacio vacío generado al cerrar la maceta y donde se acumuló el gas fue de 0,74 L.

Determinación de óxido nitroso (N_2O) mediante cromatografía de gases

Para cuantificar el N_2O procedente del suelo de cada una de las macetas se utilizó un equipo de cromatografía de gases con detector de micro captura electrónica (μECD) y acoplado a un muestreador automático. La muestra gaseosa se inyecta de forma automática en el cromatógrafo de gases y es arrastrada por el flujo de un gas portador (fase móvil, He), pasa a través de una columna capilar (fase estacionaria) donde se produce la separación del N_2O del resto de gases para posteriormente llegar al detector a través del que podrá ser cuantificado.

Cálculos y análisis estadístico

Para estudiar la evolución del N_2O durante el mes que duró el estudio, se han calculado los flujos diarios (mg N/m² día) que se determinan a partir de las concentraciones de N_2O

analizadas en las muestras recogidas a tiempo 0 y a tiempo 45 minutos y utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\frac{(T_{45}-T_0)\mu L N_2O}{L \text{ aire}} \times \frac{1 \text{ mol } N_2O}{22,4 L N_2O} \times \frac{1 L N_2O}{10^6 \mu L N_2O} \times \frac{2 \text{ moles } N}{1 \text{ mol } N_2O} \times \frac{14 g N}{1 \text{ mol } N} \times \frac{10^3 mg N}{1 g N} = \frac{mg N}{L \text{ aire}} \quad (1)$$

$$\frac{mg N}{L \text{ aire}} \times \frac{\text{Volumen de maceta (L)}}{\text{superficie de maceta (m}^2)} \times \frac{1}{45 \text{ minutos}} \times \frac{60 \text{ minutos}}{1 \text{ hora}} \times \frac{24 \text{ horas}}{1 \text{ día}} = \frac{mg N}{m^2 \cdot día} \quad (2)$$

También se han estimado las emisiones acumuladas (mg N/m²) mediante interpolaciones lineales entre las fechas de muestreo, multiplicando el flujo diario medio de dos determinaciones sucesivas por la duración del período entre el muestreo y agregando esa cantidad al total acumulado anterior.

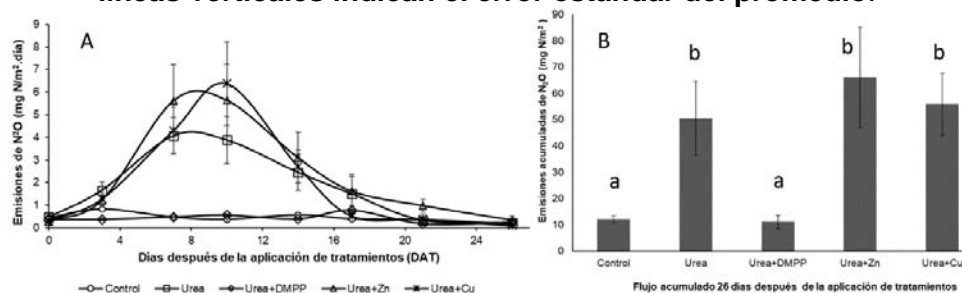
Los resultados de los flujos diarios y acumulados se han analizado estadísticamente utilizando el software StatGraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc, Warrenton, VA, EE. UU.). Los datos se han sometido a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se han comparado mediante la prueba LSD de Fisher (p=0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Emisiones de óxido nitroso (N₂O)

La Figura 1, muestra los flujos diarios y acumulados de N₂O durante el periodo comprendido entre el 7 de febrero y el 4 de marzo de 2020. Los tratamientos Urea, Urea + Zn y Urea + Cu produjeron flujos diarios más altos que el tratamiento de Urea + DMPP y el Control, mostrando picos de emisión 7 días después de la aplicación de la fertilización con Urea (4,07 ± 0,79 mg N/m²·día) y Urea + Zn (5,62 ± 1,59 mg N/m²·día), mientras que el tratamiento Urea + Cu mostró su pico más alto 10 días después de la fertilización (6,38 ± 1,84 mg N/m²·día). La aplicación de Urea + DMPP redujo las emisiones de N₂O a niveles similares a los del tratamiento control, evidenciándose una reducción significativa (p=0,02) de las emisiones de N₂O frente a los tratamientos de Urea, Urea + Zn y Urea + Cu. Los flujos acumulados más altos los produjo el tratamiento de Urea + Zn (66,07 ± 19,02 mg N/m²), seguido de la Urea + Cu (55,82 ± 11,71 mg N/m²) y la Urea sola (50,52 ± 14,11 mg N/m²).

Figura 1. Flujos diarios (A) y acumulados (B) de N₂O después de las aplicaciones de Urea, Urea + DMPP, Urea + Zn y Urea + Cu durante el periodo de muestreo. Las líneas verticales indican el error estándar del promedio.



* Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las medias.

La fertilización nitrogenada con urea produjo un aumento de las emisiones de N₂O durante los 10 primeros días después de su aplicación, excepto cuando la urea se aplicó junto con el inhibidor de la nitrificación DMPP. En este caso, las emisiones se redujeron a niveles del control sin fertilizar. El efecto inhibitorio produjo una reducción de las emisiones acumuladas del 78%. Existen varios estudios en los que se demuestra este efecto que, provoca, por un lado, la inhibición directa de la nitrificación dando lugar a mayores contenidos de NH₄⁺ y menores de NO₃⁻ en el suelo; y por otro, la inhibición indirecta de la desnitrificación, al disminuir la disponibilidad del sustrato para los desnitrificadores (Gilsanz et al., 2016). En cuanto a la aplicación de micronutrientes junto con la urea, se observó un aumento no significativo de un 23% en el caso del Zn y de un 9% en el caso del Cu. En la bibliografía, no existen casi estudios que expliquen el efecto de la aplicación

de fertilizantes nitrogenados junto con micronutrientes en las emisiones de N₂O y los que existen describen efectos contrarios. Recientemente, Montoya et al. (2018) en un ensayo en campo, en el que estudiaron el efecto de diferentes fuentes de Zn y dosis de N en un cultivo de trigo de secano, observaron que la aplicación de Zn en forma de ácidos húmicos y fúlvicos incrementó la abundancia total de los genes implicados en la producción de N₂O tanto por nitrificación como por desnitrificación, provocando un incremento en la emisión de N₂O. Sin embargo, la aplicación de Zn en forma quelada produjo el efecto inverso, reducción de las emisiones, posiblemente debido a una disminución de la disponibilidad de Cu en el suelo por quelación de los agentes quelantes añadidos con el Zn. En cuanto al Cu, se ha visto que niveles altos de este oligoelemento puede interferir en la reducción de N₂O a N₂ (Holtan-Hartwig et al., 2002) aumentando las emisiones de N₂O (Shaabad et al., 2019).

CONCLUSIONES

En este estudio de laboratorio se confirmó la capacidad de reducir las emisiones de N₂O que tienen los inhibidores de la nitrificación como el DMPP. Sin embargo, y a pesar del posible efecto inhibitorio que pudiera tener la aplicación de oligoelementos junto con el fertilizante nitrogenado descrito en algunos trabajos, en las condiciones concretas en las que se desarrolló el estudio, se observó el efecto contrario, un aumento (aunque no significativo) de las emisiones acumuladas de N₂O.

Este estudio de emisión de N₂O se debe completar con análisis del suelo utilizado (N mineral, humedad, Cu y Zn disponible), análisis de N en la cebada y producción para entender mejor los procesos microbianos que se han llevado a cabo y como los tratamientos utilizados pueden afectar también a la calidad y producción de la cebada. Además de realizar estudios adicionales en campo para evaluar la consistencia de los resultados obtenidos en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- Enwall K., Throback I.N., Stenber M., Soderstrom M, Hallin S. 2010. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 76: 2243-2250.
- Gilsanz C., Báez D., Misselbrook T. H., Dhanoa M. S., y Cárdenas L. M. 2016. *AGRICULTURE, ECOSYSTEMS & ENVIRONMENT*, 216: 1-8.
- Glass J. B. y Orphan V. J. 2012. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*, 3: 1-20.
- Holtan-Hartwig L., Bechmann M., Høyås T. R., Linjordet R., y Bakken L. R. 2002. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 34(8): 1181-1190.
- Huang Y., Ou D., Chen S., Chen B., Liu W., Bai R., Chen G. 2017. *MARINE POLLUTION BULLETIN*, 116: 434-439.
- IPCC. 2014. Climate Change 2014. Synthesis Report Summary for Policymakers. pp 31.
- MAPA. 1994. Métodos oficiales de análisis. Vol. III. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- Maris S. C., Teira-Esmatges M. R., Arbonés A., y Rufat J. 2015. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, 538: 966-978.
- Misselbrook T. H., Cardenas L. M., Camp V., Thorman R. E., Williams J. R., Rollett A. J., y Chambers B. J. 2014. *ENVIRONMENTAL RESEARCH LETTERS*, 9(11): 115006.
- Montoya M., Castellano-Hinojosa A., Vallejo A., Álvarez J. M, Bedmar J. M, Recio J., y Guardia G. 2018. *GEODERMA*, 325: 208–217.
- Myhre G., Shindell D., Bréon F. M., Collins W., Fuglestedt J., Huang J., ... y Nakajima T. 2013. CONTRIBUTION OF WORKING GROUP I TO THE FIFTH ASSESSMENT REPORT OF THE INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 659–740.
- Rolston D. E. 1986. METHODS OF SOIL ANALYSIS: PART 1 PHYSICAL AND MINERALOGICAL METHODS, 5: 1103-1119.
- Shaaban M., Peng Q. A., Bashir S., Wu Y., Younas A., Xu X., ... y Horwath W. R. 2019. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT*, 250: 109535.
- Subbarao G. V., Ito O., Sahrawat K. L., Berry W. L., Nakahara K., Ishikawa T., ... y Rao I. M. 2006. *CRITICAL REVIEWS IN PLANT SCIENCES*, 25(4): 303-335.
- Sullivan M. J., Gates A. J., Appia-Ayme C., Rowley G., y Richardson D. J. 2013. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 110(49): 19926-19931.
- Ventura R. T., Coulter J. A., y Dolan M. S. 2016. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL QUALITY*, 45(4): 1186-1195.
- Vilas M. P., Verburg K., Thorburn P. J., Probert M. E., y Bonnett G. D. 2019. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, 672: 846-854.

DETERMINACIÓN DE OLIGOELEMENTOS (Cu, Fe, Zn Y Mn) TOTALES Y ASIMILABLES (DTPA-TEA) EN UN SUELO AGRÍCOLA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA ATÓMICA

Ferré, Teresa; Díaz de Vivar, Almudena.

Tutores: García Marco, Sonia; Almendros, Patricia.

Dept. de Química y Seguridad Alimentaria, ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid

Correo electrónico (AUTORAS): teresa.ferre@alumnos.upm.es; almudena.pdiazdevivar@alumnos.upm.es

RESUMEN

Los oligoelementos como el hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y cloro (Cl) son elementos indispensables para las plantas en muy pequeñas cantidades para un buen crecimiento y desarrollo del cultivo. En este estudio se analizaron muestras de suelo para conocer la presencia de estos elementos químicos y poder incorporar aquellos que fueran necesarios. Mediante una serie de protocolos se analizaron los oligoelementos totales y asimilables. Con patrones para la calibración y las disoluciones preparadas a través de dos metodologías específicas para los elementos totales y los asimilables y un espectrómetro atómico de adsorción de llama, se midieron las concentraciones de estos elementos en cuatro muestras o repeticiones. Si bien el Fe fue el elemento más abundante en las muestras respecto al resto de elementos analizados, la baja solubilidad de todos ellos en suelos de pH altos fue crucial para la asimilación por parte de las plantas. Por ello se determina que sería recomendable realizar aplicaciones de fertilizantes específicos para cubrir las carencias y que la planta pueda alcanzar los niveles requeridos para un buen desarrollo y un rendimiento óptimo.

Palabras clave: oligoelementos, DTPA-TEA, espectroscopía.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos que necesitan obtener del medio, del suelo principalmente, elementos indispensables para llevar a cabo sus procesos fisiológicos y metabólicos. En el suelo se encuentran almacenados la mayor parte de los elementos químicos que las plantas asimilan. Dentro de estas necesidades se encuentran en muy pequeñas cantidades elementos como el hierro (Fe), el manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y cloro (Cl) (García-Serrano et al., 2009). El buen crecimiento y rendimiento óptimo de una planta o de un cultivo se debe a factores que influyen de forma positiva y, en lo que al suelo se refiere, hay que prestar especial atención a aquellos que se encuentran en pequeñas cantidades denominados oligoelementos o micronutrientes (Cuevas, 1985). Sin embargo, a pesar de estar presentes en bajas cantidades, las plantas no podrían sobrevivir sin ellos y la deficiencia en alguno puede causar fallos en el crecimiento, bajos rendimientos o baja calidad del cultivo (Hodges, 2010).

El hierro, manganeso, cobre y zinc son algunos de estos nutrientes esenciales que intervienen en procesos como la síntesis o formación de la clorofila u otras proteínas y hormonas del crecimiento. Muchos suelos no contienen la suficiente cantidad de algunos de estos elementos para satisfacer la demanda de crecimiento y producción. Por ello son necesarias aplicaciones suplementarias con algunos fertilizantes inorgánicos, que son sintetizados a través de la transformación de estos elementos presentes en la naturaleza (García-Serrano et al., 2009; Hodges, 2010).

La planta absorbe los elementos a través de su sistema radicular o sus hojas en diferentes formas. A pesar de la cantidad de elementos presentes en el suelo, solo un

pequeño porcentaje está disponible para la planta, la parte asimilable. Esta fracción se verá condicionada por las características físicoquímicas del suelo, interacción con los coloides, actividad microbiológica y condiciones (temperatura, humedad, etc.) (Hodges, 2010). Por ejemplo, su disponibilidad va a depender de un factor muy importante como es el pH que va a modificar su comportamiento en el suelo en función de su solubilidad, adsorción e inmovilidad (García-Serrano, P. et al., 2010).

La “Ley del Mínimo” es un ejemplo de cómo funcionan estos nutrientes en el suelo, “la interacción entre elementos nutritivos es positiva cuando el efecto producido por un conjunto de dos factores, en este caso nutrientes, es superior a la suma del efecto de los dos factores considerados aisladamente. De esta manera, si se satisfacen las necesidades de un cultivo en potasio se asegura la eficacia de la fertilización con nitrógeno” (García-Serrano, 2010).

El objetivo principal del informe fue determinar la cantidad de oligoelementos totales en el suelo y a su vez que parte de estos elementos estuviesen disponibles para el cultivo, ósea, los asimilables importantes para el desarrollo y crecimiento de la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la medición de los oligoelementos en el suelo existen varios protocolos utilizables, algunos están establecidos dentro del marco legal de los análisis de suelo y pueden variar por región, país o continente. Según nuestra zona geográfica y el suelo elegido, manejamos los siguientes protocolos:

1. Determinación de los oligoelementos (Fe, Mn, Cu, Zn) totales: en España se aplica la Norma Internacional ISO 14869 que expone un método que utiliza otros ácidos para la completa disolución de los elementos. En este estudio utilizamos el ácido nítrico y el clorhídrico.
2. Determinación de los oligoelementos (Fe, Mn, Cu, Zn) asimilables (DTPA-TEA): este protocolo fue desarrollado por Lindsay y Norvell (1978) para identificar suelos con deficiencia en la disponibilidad de Zn, Fe, Mn o Cu. El extractante DTPA (ácido dietiltri Aminopetaacético) con trietanolamina, DTPA-TEA, con un pH 7,3 permite extraer el Fe y los otros metales que nos interesaba medir.

Para la medición se empleó la espectroscopia atómica que, descrito de forma general, se basa en las distintas mediciones de los espectros de absorción, emisión y fluorescencia de átomos e iones elementales (*Unidad de Espectrometría Atómica*, s. f. ; Skoog, Holler & Nieman, 2008). En este experimento se utilizaron únicamente los métodos analíticos basados en la absorción atómica, “que son muy específicos, ya que las líneas de absorción atómica son considerablemente estrechas y las energías de transmisión electrónica son únicas para cada elemento” (Skoog, Holler & Nieman, 2008).

Se midió el pH del suelo mediante material instrumental (ph-metro) antes de la determinación de los oligoelementos para sacar conclusiones acertadas.

Determinación de Oligoelementos totales (Fe, Cu, Mn, Zn)

Se realizó el procedimiento con una muestra de suelo agrícola tamizado en un tamiz de 2mm. De dicha muestra se pesó 1 g en una balanza de precisión $\pm 0,001$ g en un tubo de teflón y se añadieron 10 mL de ácido nítrico (HNO_3 , concentración 65%) y 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. Se colocó en un bloque de digestión a 135°C durante 2 horas. Después se filtró sobre papel Whatman 42, recogiendo el filtrado sobre matraces aforados de polietileno de alta densidad de 100 mL y enrasando con agua para su posterior medición de elementos totales.

De la misma manera se preparó un blanco, sin añadir suelo, para descartar la concentración de elementos inicial en la propia solución y calcular únicamente las concentraciones de la muestra.

Determinación de Oligoelementos asimilables (Fe, Cu, Mn, Zn)

De nuevo con una muestra de suelo agrícola tamizado, se pesaron 10 g en un recipiente con una balanza de precisión $\pm 0,001$ g y se añadieron 20 mL de la solución extractora DTPA con una pipeta. Se dejó en el agitador durante 2 horas.

Inmediatamente después de las 2 h, con la muestra totalmente agitada y homogénea, se pasó toda la solución por un filtro Whatman número 42 hasta su filtrado completo. Esta solución fue la utilizada para determinación de los oligoelementos.

Se preparó a su vez una solución control o blanco, en el que se añadió únicamente la solución extractora sin muestra del suelo.

Lectura de concentraciones

La determinación de las concentraciones de Fe, Mn, Cu y Zn se realizó mediante espectroscopia atómica, en un espectrómetro de absorción atómica de llama. Para utilizar esta técnica, lo primero que se hizo fue un calibrado a partir de concentraciones conocidas de los elementos. Una vez hecha la recta de calibración, se pasó a la lectura de nuestra muestra la cual nos brindó la concentración puntual. En el caso de que la concentración de algún elemento fuera muy alta, como en el caso del hierro (la señal se salía de la recta), se utilizó una disolución más (1:50).

Con los resultados de las concentraciones finales en el suelo, se realizó el cambio de unidades aplicando la fórmula mostrada a continuación, ya que la lectura muestra el resultado como mg del elemento / L de la disolución.

$$[\text{Elemento}] \text{ (mg/kg suelo)} = \frac{\text{Lectura (L muestra - L blanco)}(\text{mg/L}) \times \text{Disolución} \times \text{Enrase (ml)}}{\text{Peso muestra (g)}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de Fe, Mn, Cu y Zn se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Concentración de oligoelementos totales y asimilables: Fe, Mn, Cu y Zn.

	Muestra	Fe	Mn	Cu	Zn
Concentración (mg / kg suelo)					
Elementos totales	1	16022,34	281,03	12,91	36,74
	2	13581,97	211,19	13,50	34,72
	3	14984,50	241,00	14,00	36,00
	4	16965,74	275,07	13,90	38,73
	Blanco	15,50	0,00	7,00	54,00
Media elementos totales		15388,64	252,07	13,58	35,82
Elementos asimilables	1	2,54	10,14	1,12	0,84
	2	4,28	10,30	1,34	2,62
	3	3,39	10,24	1,18	1,10
	4	5,63	10,11	1,20	1,30
	Blanco	0,42	0,00	0,00	0,04
Media elementos asimilables		3,96	10,20	1,21	1,46

Según García-Serrano et al. (2009) "el hierro es el nutriente más abundante en casi todos los suelos. No obstante, se presentan frecuentes deficiencias de hierro para los cultivos

como consecuencia de su baja solubilidad en el suelo y de la alta sensibilidad de plantas a la clorosis férrica". Como se puede ver en nuestros resultados los datos concuerdan con esta afirmación, ya que la concentración supera los 15.000 mg Fe por kg de suelo, y sin embargo la fracción asimilable es mucho más pequeña, 3,96 mg Fe por kg de suelo. Esto, según comentan los mismos autores, es consecuencia en muchos casos del alto pH y dado que en nuestro caso es 8,4 se puede afirmar que la deficiencia de hierro asimilable se deba a la característica caliza de este suelo agrícola.

Para el resto de oligoelementos sucede lo mismo, la concentración es menor que el hierro en el caso de los totales, pero en la fracción asimilable por la planta la concentración es menor para todos los casos. Los micronutrientes metálicos manganeso (Mn), zinc (Zn) y cobre (Cu) se encuentran en los suelos en concentraciones mucho más bajas que el Fe, y su problemática en suelos calizos es similar al hierro, ya que un alto pH puede inmovilizarlos (García-Serrano et al., 2009; Hodges, 2010). Dado que los requerimientos en zinc varían en función del cultivo, es difícil establecer un nivel crítico. En el caso de este elemento, las deficiencias pueden ligarse también a niveles altos de contenido de fósforo (Hodges, 2010), no obstante, no podemos afirmar que en este caso esté ligado al P, ya que sus niveles no son altos en el suelo analizado.

Para el Mn y el Cu sucede lo mismo que en los anteriores, diferentes autores afirman que la disponibilidad va a depender del pH del suelo y a pesar de que puedan afectar otros factores como el contenido en materia orgánica y la estructura del suelo entre otros, el pH va a tener el efecto más importante.

Como referencia del método utilizado los autores Lindsay y Norvell (1978) establecieron unos valores medios de referencia para los elementos analizados en su estudio. Es por eso que se considerando carencia de los elementos cuando (en suelos calizos): la concentración de Fe es menor de 4,5 mg/kg suelo; la concentración de Mn es menor de 1 mg/kg suelo; la concentración de Cu es menor de 0,2 mg/kg suelo; y la concentración de Zn es menor de 1,0 mg/kg suelo.

CONCLUSIONES

Dados los resultados del estudio y los valores de referencia descritos por los autores de la metodología empleada, se puede concluir que el hierro es un elemento que se encuentra en valores deficientes para la planta, dado que su parte asimilable es muy baja. Así mismo, cabe indicar que el factor más condicionante para la disponibilidad de los oligoelementos en la planta es el pH.

Por ello, cabría recomendar la utilización de fertilizantes de compensación para que la planta pudiera tomar aquellos nutrientes que como se ha visto están en niveles deficitarios pero que son fundamentales para un buen crecimiento y desarrollo del cultivo, para así obtener un rendimiento adecuado.

AGRADECIMIENTOS

A nuestras tutoras por la paciencia y la dedicación de enseñarnos y darnos a conocer todo lo necesario para un buen análisis de suelos y la importancia de estos elementos químicos dentro de nuestros suelos.

BIBLIOGRAFÍA

Cuevas, F. A., 1985, (19), pág. 64-66/ García-Serrano, P., 2010, pág. 23/ García-Serrano, P., Lucena, J. J., Ruano, S., & Nogales, M., 2009/ Hodges, S. C., 2010/ Lindsay, W. L., & Norvell, W., 1978, 42(3), pág. 421-428/ Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A., 2008/ <http://www.scai.uma.es/areas/aqcm/eat/eatl.html>, s.f.

ESTUDIO DE LA PRODUCTIVIDAD DE EXPLOTACIONES VACUNAS DE LECHE EN PAÍSES EN VÍAS DE DESARROLLO MEDIANTE UN SIMULADOR VIRTUAL DE GRANJAS (e-FARM)

López Gómez, Rocío; Barroso Matrán, Laura

Tutor: Villamide Díaz, María Jesús

Dept. de Producción Agraria. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

Correo electrónico (AUTORAS): rocio.lopez.gomez@alumnos.upm.es; laura.bmatran@alumnos.upm.es

RESUMEN

La práctica consiste en el manejo de tres granjas virtuales en las que varía la dieta con la que se alimenta a las vacas, adaptándolas a las materias primas del país de origen. Se trata de analizar a partir de qué cantidades y composición de la dieta, una granja de estas características puede ser rentable.

En el primer caso, una explotación localizada en Brasil, la dieta suministrada a los animales estará basada en maíz, soja y alfalfa, puesto que son productos que se encuentran entre las principales producciones agrícolas del país.

Por otro lado, se ha planteado una granja de autoconsumo en Kenia, alimentando al ganado con productos accesibles en ese país como maíz, cebada, alfalfa y soja.

Para poder comparar adecuadamente todos los casos, se utiliza una dieta control con la que se consigue la mayor producción en la granja de prueba. El análisis de los datos se centrará fundamentalmente en el consumo de alimentos, la cantidad y calidad de la leche obtenida, al igual que en los beneficios para determinar con qué tipo de alimentación sería rentable la producción de leche.

Palabras clave: granja virtual (eFarm), producción de leche, dieta.

INTRODUCCIÓN

En esta comunicación se pretende analizar si las dietas de los sistemas de alimentación de vacas de leche en dos países en vías de desarrollo de distintas regiones geográficas son rentables, analizando los pros y los contras frente a un tratamiento control. Para ello hemos trabajado con la ayuda de una granja virtual que simula las actividades diarias de una explotación. La aplicación denominada "Granja de vacas 3.0" (<http://158.109.104.137/>) ha sido desarrollada por el Servicio de Nutrición y Bienestar animal (Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos) de la Universidad Autónoma de Barcelona. La aplicación web permite modelizar una explotación bovina lechera y simular su comportamiento, definiendo los parámetros productivos de la misma y tomando decisiones relativas a la gestión de la explotación, alimentación y manejo de los animales y tratamiento de enfermedades.

TIPOLOGÍA Y NATURALEZA DEL PROYECTO: Manejo de la granja

Se generaron 3 granjas con unas 100 vacas reproductoras y sus correspondientes terneras y novillas de reposición en la aplicación e-farm. En las distintas pestañas encontramos: i) indicadores técnicos, donde se puede ver la producción actual en comparación con la inicial, los errores cometidos en las distintas actuaciones, el número de animales en la granja, etc. ii) indicadores económicos donde aparecen los costes, ingresos, beneficio actual y una gráfica de evolución de la economía de la empresa. iii) acceso a los distintos tipos de animales.

Las actividades diarias que hay que realizar en la granja virtual:

Revisión de indicadores: fallos de sesiones anteriores y número de animales en la explotación.

1. Inseminación: se observará a las vacas o novillas que se encuentren entre los 18 y 24 días del ciclo estral, cuando se observe el símbolo de monta será el momento de inseminar.
2. Secado de las vacas en el día 220 de gestación.
3. Diagnóstico de gestación: a partir del día 35 desde la última cubrición.
4. Enfermas: observar los síntomas, tratar al animal y retirar su leche durante una semana, hasta que pasen los efectos del tratamiento utilizado.
5. Dieta: se ajustaría este apartado a diario para intentar superar el nivel de producción, cuidando de la disponibilidad de alimentos de la región geográfica.
6. Neonatos: identificar al ternero con el crotal, desinfectar el cordón umbilical y alimentarlos con 2 litros de calostro 2 veces al día los 2 primeros días de vida.
7. Lactantes: se programa su alimentación automática con 2 litros de leche 2 veces al día teniendo además pienso y agua a su libre disposición. En el caso de que tengamos machos, se venderán a los 8 días del nacimiento. El destete se llevará a cabo cuando el animal consuma un kg de pienso, a los 60 días de vida.

El no llevar a cabo correctamente las tareas diarias o la modificación de la dieta provoca cambios en la producción y en los beneficios de la explotación. La granja control es una explotación típica de un país desarrollado la cual dispone de todo tipo de recursos tanto en alimentación (ya sea por productos de origen o importados) como en maquinaria, por lo que los rendimientos van a ser máximos. Para Brasil y Kenia se han simulado granjas con las mismas condiciones que la control, es decir, mismo número de animales y mismo precio de los alimentos que constituyen la dieta del ganado. En la práctica, una explotación en Brasil puede asumir las características generales atribuidas a la granja control, ya que, aunque se considera un país en vías de desarrollo tiene los medios suficientes para conseguir su correcto funcionamiento. En cuanto a Kenia, el país con menos oportunidades con respecto a los anteriores, tendrá un número más reducido de vacas y probablemente la maquinaria se vea algo limitada.

Con respecto a los costes de alimentación, tanto en Kenia como en Brasil, son inferiores a los estipulados en el simulador (correspondientes a precios internacionales). La granja virtual no permite modificar los precios del pienso que recibe el ganado, pero se deberán tener en cuenta a la hora de implementar las explotaciones en estos dos países.

En Brasil encontramos una agricultura cada vez más diversificada que adquiere una creciente relevancia en el mercado mundial según los datos de la FAO (Salazar y Brandao, 2004). La superficie cultivada es de alrededor de 50 millones de hectáreas y los pastizales ocupan 178 millones de hectáreas. Respecto a su producción de leche, Brasil es el sexto productor mundial con 2.000 millones de litros de este producto. La dieta a implementar en la explotación lechera estará basada en silo y harina de maíz, harina de soja (producto del que Brasil es exportador) y alfalfa como producto del pastizal. Se tenderá a suministrar más cantidad de los productos más abundantes, en este caso, soja y alfalfa.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, el país dispone de gran proporción de pastizal que serviría para abastecer de alimento a los animales en épocas de escasez, aunque supondría una bajada de la producción lechera.

Kenia es un país con menos riqueza que Brasil que vive principalmente de la agricultura (incluyendo la ganadería, silvicultura y pesca) representando el 27% del PIB y suponiendo el 60% de ingresos por exportaciones (Nvangito, 2000). La mayor parte de explotaciones son de tipo familiar en las que, a pesar de que siempre han sido de subsistencia y autosuficiencia, forman una parte importante dentro de la economía. Se trata de un país con 276.300 km² de superficie agrícola (casi el 50% de la superficie total). Los productos más exportados son el café, té, frutas y hortalizas, y como importaciones destacan el arroz, trigo y aceites vegetales.

Para el proyecto en Kenia la dieta que se aplicaría al ganado estaría principalmente formada por maíz, ya que es un producto accesible y abundante, y cebada y alfalfa por

ser alimentos esenciales de los que se puede disponer fácilmente. Con respecto a la soja, no hay datos concretos, pero se presupone que se podría cultivar allí por las favorables condiciones edafoclimáticas. Dentro de la economía keniana, la producción de leche es muy importante. En 2006 el país contaba con 12,4 millones de cabezas de ganado vacuno. Con estos datos, se concluye que, a pesar de que la alimentación del ganado sea competitiva con la de la población, pueden permitirse desarrollar granjas de autoconsumo o de producción local.

A continuación, se expondrán los modelos utilizados:

- Granja control: se utiliza una única dieta con todos los productos disponibles en diferente cantidad. En la figura 1 se muestra la composición en materias primas de las dietas.
- Granja Brasil: se utilizará en mayor medida maíz y soja como productos con alto contenido en almidón y proteínas respectivamente, con el fin de aumentar la producción.
- Granja Kenia: se utiliza mayoritariamente maíz, alfalfa y, a diferencia de Brasil, es importante el uso de cebada que aportamos en la dieta.

Figura 1. Composición en materias primas de las raciones



RESULTADOS

Los datos de la Tabla 1 muestran la cantidad de alimento que requieren las vacas para potenciar su producción y el coste económico. Las cantidades en las explotaciones de Kenia y Brasil han sido estudiadas y valoradas en función de la disponibilidad de los productos de cada país. Los costes se han estimado automáticamente a partir de la granja virtual según los kilos de cada alimento aportado.

Tabla 1. Cantidad de las dietas utilizadas en cada granja, costes de producción y productividad de esta.

	Control	Brasil	Kenia
Dieta suministrada (kg/vaca y día)	22,5 kg	18,0 kg	18,0 kg
Coste de la alimentación (€/vaca y día)	92,7 €	74,16 €	61,92 €
% grasa láctea	3,68 %	3,72 %	3,71 %
% proteína láctea	3,14 %	3,11 %	3,12 %
Producción de leche (kg/vaca en ordeño y día)	36,80 l	29,87 l	28,12 l
Beneficios por vaca y día	1,01 €	0,11 €	0,083 €

El sistema simula la producción de leche total diaria y los beneficios netos de la explotación, siempre que se hayan ejecutado correctamente todas las tareas expuestas anteriormente.

Tanto la producción de leche como los beneficios se han dado por vaca y día con el propósito de que las conclusiones de este estudio sean implementables en las hipotéticas explotaciones de Kenia y Brasil.

La granja control consiguió un mayor nivel de producción que las demás. Esto es debido a que representa una explotación en un país desarrollado con los suficientes recursos para maximizar los beneficios.

Aunque haya restricciones en la dieta, se ha conseguido que las vacas puedan seguir produciendo cantidades elevadas de leche en función de los productos mayoritarios de cada país. Con respecto a la maquinaria y el manejo de los animales, Kenia tendría más dificultades para la inseminación ya que no siempre se va a poder acceder a la tecnología que se requiere. A pesar de ello, la mayor parte de actividades son viables considerando entonces que el simulador contribuye en alto grado al conocimiento de la productividad de la granja. Brasil no presentaría ningún cambio en el manejo de los animales.

Otro de los inconvenientes tratados anteriormente, es que ciertos alimentos que se proporcionan al ganado pueden servir como alimentación para los seres humanos y, tratándose de países en desarrollo, lo primordial es proporcionar una buena alimentación a estas poblaciones. Sin embargo, tanto Kenia como Brasil son dos países que, considerándose en vías de desarrollo, podrían permitirse la creación de granjas. En el caso de Kenia, con una producción más reducida que en Brasil ya que su poder adquisitivo es menor. En ambos casos se busca un mayor rendimiento con respecto a la producción de leche y no tanto el beneficio económico que, como se observa en la Tabla 1, en ambos países está muy por debajo del de la granja control.

En definitiva, se ha conseguido aproximar la cantidad de cada producto que debería añadirse a la dieta para que la producción de leche sea rentable. En el caso de Brasil, se ha considerado una explotación de un tamaño similar al control debido a que se trata de un país más tecnificado que posee mayor proporción de importaciones y exportaciones, además de relevancia internacional por su producción lechera. El planteamiento que se sugiere para Kenia es una granja adaptada a las condiciones del país por lo que no sería viable producir en las mismas dimensiones que en Brasil. No obstante, se defenderá la creación de una granja de autosuficiencia en este país por dos razones:

- Según los últimos datos disponibles (2006) las importaciones de productos lácteos fueron nulas, esto puede deberse a que los aranceles impuestos por el Estado son muy altos, por tanto, no interesa introducir productos extranjeros. Por este motivo creemos que la mejor solución es llevar a cabo una producción nacional que satisfaga la demanda interna. Esta medida daría lugar a un mercado más justo para los productores.

- La propuesta iniciada conlleva una maximización en la producción de leche, es por ello que la granja no sólo abastecería el consumo de una familia, sino que existiría excedente suficiente para toda una localidad.

Para finalizar, este proyecto nace desde una perspectiva social con el fin de llevar a cabo dos explotaciones en países en vías en desarrollo utilizando los recursos de los que disponen, satisfaciendo las necesidades primarias y sin tener que depender de las importaciones de otros países.

BIBLIOGRAFÍA

Buchot E. 2018. La economía de Kenia (https://www.voyagesphotosmanu.com/economia_kenia.html) (12/03/2020).

Knoema. 2020. Estadísticas regionales y mundiales, datos nacionales, mapas, clasificaciones. 2020 (<https://knoema.es/atlas>) (12/03/2020).

Nvangito H., 2000. Agricultura, comercio y seguridad alimentaria: Cuestiones y opciones para las negociaciones de la OMC. Desde la perspectiva de los países en Desarrollo. Kenia. (<http://www.fao.org/3/x8731s/x8731s09.htm>) (12/03/2020).

Salazar A. y Brandão, P. 2004. Acuerdo sobre la Agricultura de la OMC. La Experiencia de su Ejecución. Estudios de casos de países en Desarrollo. Brasil. FAO. (<http://www.fao.org/3/y4632s/y4632s09.htm#bm09>) (10/03/2020)

NUEVOS DATOS SOBRE EL CONTROL DE AUTORIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE CANCEROSAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME A TRAVÉS DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE PIGMENT EPITHELIUM DERIVED FACTOR

Alegría, Nicolás; Astorgano, David; Quiroz, Josefa; Menéndez, Adrián.

Tutor: Ramírez-Castillejo, Carmen

Dept. de Biotecnología-Biología Vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico (AUTORES): nicolas.alegría.aravena@gmail.com, d.astorgano@alumnos.upm.es, josefa.quiroz@gmail.com, adrian.menendez.rey@alumnos.upm.es, mariadelcarmen.ramirez@upm.es

RESUMEN

La resistencia al cáncer y la recaída son uno de los principales problemas médicos a nivel mundial, principalmente debido a las células madre tumorales, que presentan una proliferación asimétrica, generando dos poblaciones con cinética de división diferente. Las células que se dividen rápidamente dentro de un tumor, por lo general, se controlan mediante quimioterapia; sin embargo, las células madre tumorales, caracterizadas por su perfil de división lenta, sobreviven y promueven la regeneración de un nuevo tumor, lo que conlleva a la recaída del paciente. Estas células de división lenta expresan varias proteínas que ayudan a bombear sustancias tóxicas y activar vías de señalización que promueven a una mayor resistencia celular. Hasta ahora, el factor derivado del epitelio pigmentario se ha caracterizado como mediador de la carcinogénesis. El objetivo de este trabajo fue probar su extremo C-terminal en combinación con el agente quimioterapéutico Temozolamida, para el tratamiento de Glioblastoma Multiforme y su posible efecto sinérgico en la interferencia de la división de este tipo de células. Los resultados obtenidos afirman que, después de añadir el extremo C-Terminal, la dosis requerida del medicamento para alcanzar su concentración inhibitoria media se reduce en un 10%. Además, las proteínas BCRP1, EpCAM y AC133 se sobreexpresan en Glioblastoma Multiforme, lo que explica su alta resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos. Por último serán necesarios más estudios para evaluar la presencia de células madre tumorales.

Palabras clave: glioblastoma multiforme, Factor Derivado del Epitelio Pigmentario, célula madre tumoral.

INTRODUCCION

Hoy en día, la medicina se enfrenta a dos problemas en relación con el tratamiento del cáncer. Estos problemas son la resistencia farmacológica y la recaída del paciente y, aunque no lo parezca, están interrelacionados. Este último se relaciona con el tipo de tumor tratado, que por lo general oscila entre un rango de 40-70%, mientras que en casos más severos, es de 100% (Burt Nabors *et al.*, 2018; Escobar, 2004).

La comunidad tumoral es heterogénea. Entre esta se encuentran las células madre tumorales CSC (por sus siglas en inglés). Estas células poseen características asimétricas, baja tasa de división y resistencia a tratamientos debido a proteínas bombas y de reparación celular. De este modo, generan nuevos tumores y conducen al paciente a una recaída (Cheray *et al.*, 2017; Lytle *et al.*, 2018).

Una de las patologías cerebrales con mayor índice de mortalidad (5% de supervivencia tras 5 años), corresponde al Glioblastoma Multiforme (GBM). Se trata de un tumor cerebral capaz de afectar al sistema nervioso central (Nabors *et al.*, 2018; Siegel *et al.*, 2016). Se caracteriza por un elevado número de recaídas a corto plazo y una alta resistencia a tratamientos. Hasta el día de hoy, el tratamiento con mejores resultados corresponde al quimiofármaco temozolamida (TMZ), extendiendo la vida media del paciente sin progresión tumoral hasta 2 años (Siegel *et al.* 2016). Este tratamiento inhibe la replicación celular, promoviendo la degradación del ADN en el ciclo G2/Mitosis (Lee,

2017). Sin embargo, el problema radica en que las CSCs eliminan estas sustancias por mecanismos asociados a proteínas transmembrana o reparadoras de ADN. Por este motivo, se ha buscado disminuir o erradicar la acción patológica de CSCs. Un candidato experimental corresponde al Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF). Se trata de una glucoproteína que actúa como regulador del crecimiento celular (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006). De esta manera se ha demostrado que el tratamiento de células tumorales con ciertos fragmentos de esta proteína altera la tasa de división y promueve una mejor acción de terapias. Por ello, si se logra generar una tasa de proliferación acelerada, las CSCs perderán sus características, logrando disminuir la tasa de recaída de los pacientes (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006; Castro-García *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2018). Por tal motivo, se quiso reducir la dosis utilizada de Temozolamida para obtener el IC50 de la línea celular CT2A mediante el uso del extremo C-terminal (CTE).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo Celular: Se establecieron cultivos celulares a partir de glioblastoma murino correspondiente a la línea celular CT2A, procedente del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España) del laboratorio dirigido por la doctora Pilar Sánchez Gómez. Las células fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagles Medium, suplementado con Suero Fetal Bobino al 10%, glutamina 200 mM y penicilina/estreptomicina 10.000/10.000 U/ml e incubadas en condiciones estándar a 37 °C con una concentración de CO₂ a 5% (v/v).

Estudio de viabilidad celular/ Ensayo MTT: Los ensayos fueron llevados a cabo en placas de 96 pocillos con una concentración de 80.000 células/ml. Se realizaron cinco tratamientos de TMZ a concentraciones de 0,0, 0,4, 0,8, 1,6 y 3,2 mM, bajo cuatro condiciones de CTE a 51,4, 205,7 y 414,3 mM, e incubados durante 72 h a 37 °C con 5% (v/v) de CO₂. Posteriormente, las células fueron incubadas con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a una concentración de 0,5 mg/ml durante 30-120 min a 37 °C en oscuridad. Los cristales producidos por las células viables fueron resuspendidos en DMSO. La lectura de absorbancia se llevó a cabo en espectrofotómetro de microplacas a 492 nanómetros (nm).

Cinética de división celular: Se marcaron 500.000 células utilizando la sonda fluorescente Cell Trace @Far-Red DDAO-SE 1:1.000. Seguidamente, fueron sembradas e incubadas a distintos tiempos (0, 3 y 6 días). Finalmente, se fijaron con paraformaldehído (PFA) 1% (v/v). Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo evaluando Alociocianina (APC) a 660 nm.

Citometría de flujo: Se recogieron 1.800.000 células/ml para 9 tubos de microcentrífuga, las que fueron fijadas con PFA al 1% (v/v) durante 10 min. Para anticuerpos intracelulares, se aplicó tratamiento previo con triton 100X a 0,5% (v/v) durante 5 min. Tras ello, se bloquearon las uniones inespecíficas con leche desnatada a 5% en PBS (p/v) durante 1 h en agitación. Seguidamente fueron centrifugadas a 450 g durante 5 min, y se retiró el sobrenadante. El pellet fue resuspendido e incubado con anticuerpos durante 1 h a temperatura ambiente en agitación (Tabla 1). Se realizaron tres lavados con PBS y centrifugación a 450 g. Finalmente se resuspendió el pellet en PBS. Las muestras con anticuerpos intracelulares se incubaron previamente con anti-rabbit 1:500 durante 45 min a temperatura ambiente en agitación. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Tabla 2. Descripción de anticuerpos usados para la caracterización celular

Ac	AC133	CD133	CD34	BCRP1	EpCAM	HSP90	p53	A-Rabbit
Abs	578	578	660	578	578	-	-	578
Dilución	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:300	1:300	1:500

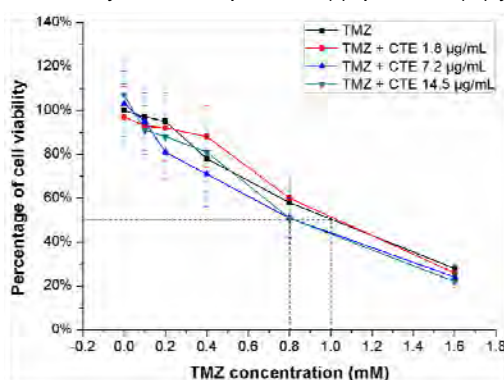
Ac: Anticuerpo; **Abs:** Absorbancia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento de la línea celular CT2A al ser sometida a un tratamiento con distintas concentraciones de TMZ en combinación de CTE de PEDF se muestra en la Figura 1. Se observa cómo las concentraciones ensayadas son capaces de alterar el ciclo celular de manera que el quimiofármaco aumentó su efecto a dosis más bajas, específicamente a un 10% menos de dosis. La mejor combinación encontrada fue de CTE a concentración de 205,7 mM, la que aumentaba la cinética de división en un $39\% \pm 0,1$. Esta fue capaz de llevar el IC50 de TMZ de 1,08 mM a 0,96 mM (Figura 1). Esto podría ocasionar que las células resistentes pierdan sus características y se vuelvan vulnerables al tratamiento (Castro-García *et al.*, 2013; Lee, 2017).

Figura 1. Viabilidad celular bajo condiciones de TMZ en combinación de CTE.

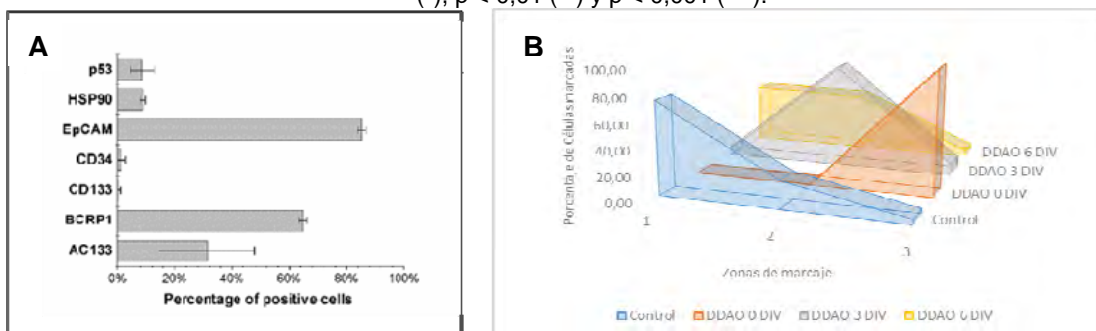
Curva dosis respuesta para células CT2A bajo condiciones de tratamiento, n=18. Para análisis estadísticos se utilizó, test Mann-Whitney U, donde $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).



Resultados previos del grupo asumen que las dosis del medicamento utilizadas en otras líneas celulares como la C6 son menores (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006; Castro-García *et al.*, 2013). Esto se puede explicar por la gran cantidad de proteínas encontradas capaces de generar resistencia ante tratamientos quimioterapéuticos, las que son proteínas de reparación celular o expulsión de sustancias, pertenecientes a las CSCs (Figura 2 A) (Reya *et al.*, 2001; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2008). Además, trabajos realizados con anterioridad, asemejan la presencia de proteínas transmembrana, como BCRP1 y AC133, con la presencia de CSCs (Reya *et al.*, 2001; Lytle *et al.*, 2018) y la resistencia ante los tratamientos administrados.

Figura 2. Porcentajes de proteínas identificadas y cinética de división con DDAO.

Datos obtenidos por citometría de flujo. A) Corresponde al nivel de expresión de biomarcadores de membrana e intracelulares. B) Porcentaje de células marcadas con DDAO transcurrido 0, 3 y 6 días. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).



Los resultados relativos a la citometría de flujo mostraron presencia de las proteínas EpCAM, BCRP1 y AC133 en altos porcentajes, lo que indica expulsión del tratamiento, mientras que los niveles de p53 y HSP90 podrían estar regulando los daños celulares

ocasionados por la quimioterapia (Lytle *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). El ensayo de cinética de división celular nos muestra las tasas de división a distintos tiempos. Transcurridos 6 días de incubación se muestra un $0,44\% \pm 2,56$ de células marcadas, dándonos indicios de la presencia de células madre (Figura 2 B). Esto nos podría otorgar una correlación con los datos de marcaje proteico, en los subtipos AC133, HSP90 y p53. Por tanto, si consideramos que la dosis óptima del fármaco fue modificada por CTE, la población celular con alto nivel de retención de colorante DDAO podría corresponder específicamente a las CSC por su tasa de división lenta (Lytle *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

En conclusión, CTE de PEDF puede reducir la resistencia quimioterapéutica de la línea celular CT2A con el tratamiento TMZ en un 10%. Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer si la población celular es capaz de retener colorantes DDAO tras estar expuesta a los tratamientos. La expresión de BCRP1, EpCAM y HSP90 son indicadores de quimioresistencia en la línea celular. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que confirmen la presencia y acción de otras proteínas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Pilar Sánchez y a el Dr. Ceferino Maestu por su apoyo dentro del proyecto. También agradecemos a la UPM por la financiación del proyecto PINDV-18-KOIDZCD-102-T2D5FO.

BIBLIOGRAFÍA

- Nabors, L. B., *et al.*, (2018). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Central Nervous System Cancers. 1.2017.
- Castro-García, P., *et al.*, (2013). C-Terminal-PEDF Reduces IC50 Doses and Chemoresistant Population of CD133 and BCRP1-Positive Cancer Stem Like Cells. 2 ; 195-208.
- Cheray, M., *et al.*, (2017). Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma. Chapter 4.
- Escobar, A., (2004). Glia y tumores. Los nuevos conceptos sobre las funciones de la neuroglia astrocitaria y los mecanismos de su transformación en gliomas. 5 ; 571-574.
- Huang, K., *et al.*, (2018). Pigment epithelium-derived factor in lipid metabolic disorders. 41 ; 102-108.
- Lee, C. Y., Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment. (2017). 10 ; 265-270
- Lytle, N. K., *et al.*, (2018). Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. 18 ; 669-680.
- Ramírez-Castillejo, C., *et al.*, (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. 9 ; 331-339.
- Reya, T., *et al.*, (2001). Resultados de búsqueda Resultados de la Web Stem cells, cancer, and cancer stem cells. 414 ; 105-111.
- Siegel, R., *et al.*, (2016). Cancer statistics, 2016. 66 ; 7-30.
- Sánchez-Sánchez, F., *et al.*, (2008). Expression and purification of functional recombinant human pigment epithelium-derived factor (PEDF) secreted by the yeast *Pichia pastoris*. 134 ; 193-201.
- Zhang, Y., (2018) Resultados de búsqueda Resultados de la Web The p53 Pathway in Glioblastoma 10 ; 297.

APLICACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE SYNSEPALUM DULCIFICUM (SCHUMACH.) DANIELL

Quiroz, Josefa¹; Menéndez, Adrián^{1, 2}; Alegría, Nicolás¹

Tutores: Ramírez, María del Carmen¹; Bensadon, Loan²

¹Dept. de Biotecnología y Biología. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

²Medicinal Gardens S.L. BaiaFood

Correo electrónico (AUTORES): josefa.quiroz@gmail.com; adrian.menendez.rey@alumnos.upm.es;

nicolas.alegria.aravena@gmail.com

RESUMEN

Los efectos beneficiosos de *Synsepalum dulcificum* (Schumach.) Daniell, comúnmente conocida como baya milagrosa, se atribuyen a que transforma los sabores ácidos en dulce luego de su consumo, esto debido al contenido de la proteína miraculina, y a su alto contenido de fenoles con propiedades antioxidantes. Esta fruta aún no ha sido explotada en la Unión Europea, no obstante, Baia Food Co. ha presentado un dossier a la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, con el fin de autorizar su comercialización exclusiva. Hasta el momento, del mismo modo que con la proteína, los subproductos de esta fruta son provechosos para la salud humana como son los antioxidantes, con los que se puede crear un complemento alimenticio. De este modo, determinar la presencia y concentración de estos compuestos en la fruta es de enorme importancia. Por este motivo se evaluó la extracción de fenoles con diferentes extractantes: disolventes eutécticos profundos naturales; alcohol y agua destilada; y por consiguiente, se cuantificó el valor antioxidante frente a dos productos de referencia: Aguacate y Ciruela roja.

Palabras clave: *compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, Synsepalum dulcificum.*

INTRODUCCION

La importancia de los fenoles ha propiciado numerosos estudios dedicados al desarrollo de métodos para su extracción. Los radicales libres al estar en exceso en nuestro cuerpo causan estrés oxidativo en las células siendo responsable de diferentes patologías. Se ha comprobado que los fenoles disminuyen el estrés oxidativo en diferentes enfermedades crónicas y ayudan a controlar la inflamación intestinal, la artritis e incluso el asma. En *Synsepalum dulcificum* (Schumach.) Daniell se han identificado mediante cromatografía entre otros fenoles: quercetina, kaempferol, miricetina. Los tres compuestos benéficos para la salud (Buckmire y Francis 1976). Actualmente para la obtención de fenoles se utiliza disolventes orgánicos, cuyo remanente limita la aplicación de los extractos debido a su toxicidad e impacto medioambiental. En esta última década han surgido disolventes naturales que permiten un rendimiento igual e incluso mayor que los convencionales, denominados solventes naturales eutécticos profundos (NADES por sus siglas en inglés) siendo denominados ecológicos, debido a que protegen tanto el medio ambiente como la salud de los consumidores. Estos se definen como una mezcla de dos o más componentes constituyentes de aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares o derivados de colina. Estos son: biodegradables, biocompatibles, biorenovables, baratos, seguros y capaces de formar mezclas eutécticas a través de interacciones de puentes de hidrógenos (Vanda *et al.*, 2018). El objetivo de este trabajo fue evaluar la extracción de compuestos fenólicos de *S. dulcificum* con extractantes naturales frente a extractantes convencionales y cuantificar el valor antioxidante de los grupos fenólicos obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal: Baía Food Co. proporcionó el producto Miractin® Whole Fruit Powder procedente de Ghana, el que se usó en los experimentos. Este consiste en un polvo deshidratado de bayas de *S. dulcificum* (Sapotaceae) conservado en bolsas de aluminio con cierre hermético a -4 °C. Para su uso, se esperó a que los sobres con *S. dulcificum* estuviesen a temperatura ambiente. Según Jm *et al.* (2012) la pulpa y piel de “*Prunus doméstica*” (ciruela) variedad Damson de origen español, tiene un alto porcentaje de actividad antioxidante motivo por el que se consideró como control positivo y la pulpa de “*Persea americana*” (aguacate) variedad Hass de origen peruano no posee una elevada actividad considerándolo como control negativo.

Preparación de disolventes eutécticos profundos naturales: Se prepararon siete disolventes eutécticos profundos naturales según molaridad como se observa en la Tabla 1. Mediante agitación magnética a 80 °C se homogenizaron las mezclas hasta obtener un líquido translúcido.

Tabla 1. Combinaciones de disolventes eutécticos profundos naturales.

Nombre(extractantes)	Compuesto 1	Compuesto 2	Relación molar	Agua (% p/v)
LG	ácido láctico	D(+)-glucosa	5:1	0
PM	L-prolina	ácido DL-málico	1:1	20
CS	cloruro de colina	sacarosa	4:1	20
CM	cloruro de colina	maltosa 1-Hidrato	1:2	20
MC	ácido DL-Málico	cloruro de colina	1:1	20
PG	L-Prolina	Glicerol	2:5	20
CL	cloruro de colina	ácido láctico	1:2	20

Extracción fenólica con solventes disolventes eutécticos profundos naturales: Se homogeneizaron 150 mg de *S. dulcificum* D. con 1,5 mL de cada NADES. La extracción se realizó mediante agitación magnética constante entre 4,7 – 5,7 g durante 1 h 30 min a 40 °C. Luego, se añadieron 1,5 mL de agua destilada. Se centrifugó a 5.000 g durante 20 min a 20 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante se almacenó a -20 °C. Se realizaron 5 replicadas con cada extractante.

Extracción fenólica métodos convencionales: Se homogeneizaron 150 mg de *S. dulcificum* con 1,5 mL de disolvente, realizando cuatro métodos: Agua destilada (H₂O); Etanol 70 % (v/v) (EtOH); Metanol absoluto (MeOH) y metanol 70 % (v/v) (MeOH 70 %). La extracción se realizó mediante agitación magnética constante entre 4,7 – 5,7 g durante 1 h 30 min a 20 °C. Se transfirió la mezcla a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se centrifugó a 11.000 g durante 20 min a temperatura ambiente. El precipitado se descartó y el sobrenadante se almacenó a -20 °C. Se realizaron 5 réplicas con cada extractante.

Cuantificación de fenoles totales: La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu modificado (Waterhouse, 2002). Se realizó dilución 1:100 con los extractos fenólicos a un volumen final de 1 mL. Luego se añadieron 50 µL de reactivo de Folin y se dejó reposar 15 min. Se agregaron 150 µL de carbonato de sodio al 20 % (p/v) y se dejó reposar durante 2 h en oscuridad. Se utilizó como blanco cada disolvente correspondiente sin muestra. Se midió absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresaron mg de ácido gálico por gramo de muestra. Se realizaron dos mediciones para cada extracto obtenido.

Capacidad captadora de radicales libre DPPH: La actividad antioxidante se llevó a cabo con el método de Bondev modificado (Bondet *et al.*, 1997). Se prepararon 250 µL de cada muestra a 1 mg/mL, luego se añadió 1 mL del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por DPPH a 20 mg/mL (compuesto orgánico susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante) se dejó reposar 30 min y se midió la absorbancia a 492 nm. Los

resultados se expresaron en mM de Trolox por gramo de muestra. Se realizaron dos mediciones para cada extracto obtenido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se puede observar que cuatro de los siete NADES probados tuvieron mejor rendimiento de extracción que los métodos convencionales, superándolos hasta un 50 % en el caso del PG. Esto es debido a las interacciones de unión de hidrogeno entre las moléculas de NADES y los compuestos fenólicos, es decir, su nivel de polaridad, ya que esto le confiere su capacidad de solubilización (Dai *et al.*, 2013a; Dai *et al.*, 2013b). Por tanto, los mejores resultados obtenidos fueron con el uso de Cloruro de Colina: Maltosa y Prolina: Glicerol. Esto se debe a dos razones, en primer lugar se encuentran las características de los grupos fenólicos (conformación química y anillos aromáticos); y en segundo lugar, las aperturas de la matriz conformacional que ejercen los extractantes, exponen zonasceptoras de hidrogeno (H), lo que mejora en cierta medida la extracción fenólica, por unión a compuestos objetivos tras aceptación de hidrógenos pertenecientes a esto (ver Figura 2) (Haslam, 1996; Huang *et al.*, 2017).

Figura 1: Contenido de fenoles totales de *S. dulcificum* (mg ácido gálico/g *S. dulcificum*). Capacidad de extracción fenólica de once tipos de solventes mediante el protocolo establecido en este trabajo. Significación estadística de la comparación de extracciones con disolventes eutécticos profundos naturales y extracción con métodos convencionales EtOH 70 %. $p < 0,05$ (*); $p < 0,001$ (**); $p < 0,001$ (***) ; $p < 0,0001$ (****); Alfa: 0,98

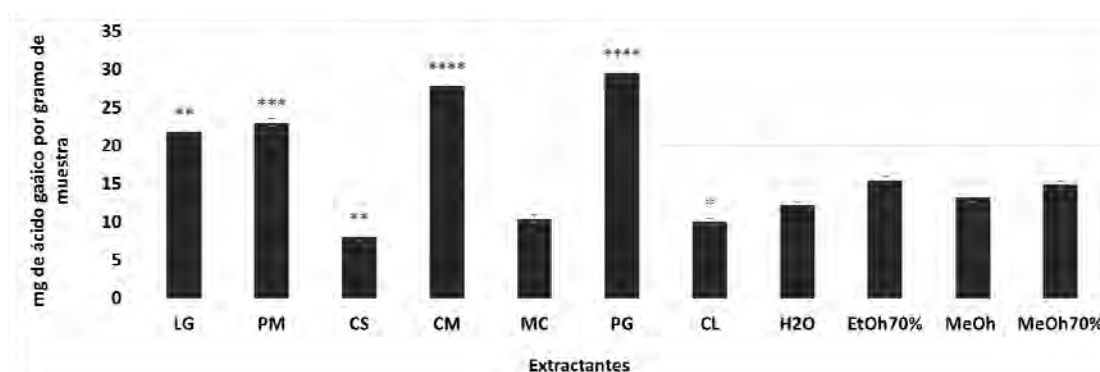
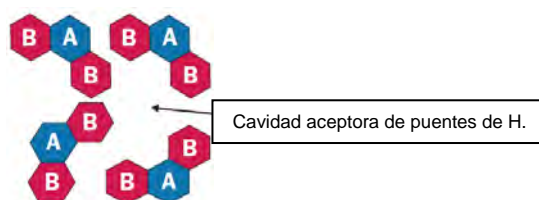
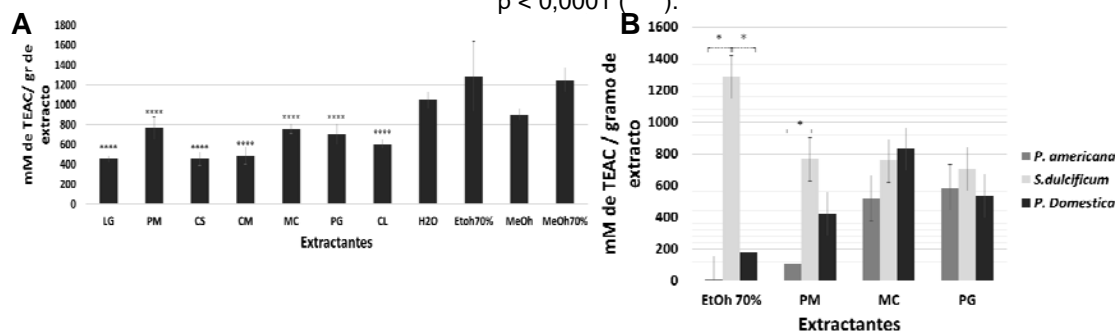


Figura 2: Representación de la matriz conformacional de NADES. Representación de la matriz captadora de compuestos objetivos, donde A y B son compuestos distintos de la mezcla NADES.



La cantidad de extracto fenólico de *S. dulcificum* realizado con etanol superó significativamente a los correspondientes extractos de *P. americana* y *P. domestica*: 1.283, 10 y 175 mM, respectivamente. En relación a *S. dulcificum* el valor es mayor a reportado en otros artículos (Galanakis, 2017). *S. dulcificum* tiene mayor cantidad de éstos, sin embargo, no se ha podido obtener un valor similar con NADES (Figura 3B). Como se observa en la Figura 3A, los métodos convencionales son capaces de extraer compuestos con mayor capacidad antioxidante. Esto podría estar dado por la complejidad de las moléculas involucradas, así como su solubilidad, fuerza redox, etc, lo que establecería su afinidad según solvente. En este sentido, se hace necesario identificar los grupos fenólicos que se logran extraer para así relacionarlos con su poder antioxidante (Manigandan *et al.*, 2015; Mosquera *et al.*, 2009).

Figura 3: Capacidad antioxidante (mM trolox/g de muestra). Actividad antioxidante de extractos (A) *S. dulcificum* con once extractantes. Con asteriscos se marca el nivel de significación de las diferencias entre la actividad antioxidante de extracciones con NADES y con EtOH 70%. (B) De *S. dulcificum*, *P. americana* (control negativo) y *P. domestica* (control positivo), con el extractantes etanol 70% y PM, MC y PG. Con asteriscos se marca el nivel de significación de las diferencias entre los controles dentro del mismo método de extracción y los segmentos horizontales relacionan los controles que presentaron una diferencia significativa. TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al trolox. $p < 0,05$ (*); $p < 0,001$ (**); $p < 0,001$ (***); $p < 0,0001$ (****).



CONCLUSIONES

Los disolventes eutécticos profundos naturales prolina:málico, cloruro de colina:maltosa y prolina:glicerol mostraron mejor rendimiento de extracción fenólica que los métodos convencionales tanto para *S. dulcificum* como *P. domestica* y *P. americana*, no así, en su poder antioxidante puestos que los métodos convencionales muestran un mayor valor que los disolventes eutécticos profundos naturales.

S. dulcificum posee una capacidad antioxidante mayor que *P. doméstica* y de productos alimenticios reportados como ricos en poder antioxidante (arándano, mora o fresa). Las propiedades beneficiosas para la salud de la fracción fenólica *S. dulcificum* deberían ser estudiadas *in vitro* e *in vivo* para poder desarrollar y lanzar al mercado nuevos productos nutraceuticos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto IND2017/BIO-7827 financiado por la Comunidad de Madrid

BIBLIOGRAFÍA

- Andrew L. Waterhouse. 2002. "Determination of Total Phenolics." 6; 1–8.
- Bondet, V., W. Brand-Williams, and C. Berset. 1997. "Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH.Free Radical Method." 30; 609–15.
- Buckmire, R. E. and F. J. Francis. 1976. "ANTHOCYANINS AND FLAVONOLS OF MIRACLE FRUIT, *Synsepalum Dulcificum*, Schum." 41; 1363–65.
- Charis M. Galanakis. 2017. "Introduction." *Nutraceutical and Functional Food Components* 1; 1–14.
- Dai, Yuntao, Jaap van Spronsen, Geert-Jan Witkamp, Robert Verpoorte, and Young Hae Choi. 2013a. "Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology." 766; 61–68.
- Dai, Yuntao, Geert-Jan Witkamp, Robert Verpoorte, and Young Hae Choi. 2013b. "Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus Tinctorius* L." 85; 6272–78.
- Haslam, E. 1996. "Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action." 59; 205–15.
- Huang, Yao, Fang Feng, Jie Jiang, Ying Qiao, Tao Wu, Josef Voglmeir, and Zhi Gang Chen. 2017. "Green and Efficient Extraction of Rutin from Tartary Buckwheat Hull by Using Natural Deep Eutectic Solvents." 221; 1400–1405.
- Jm, Morillas-Ruiz, Delgado-Alarcón Jm, Dra Juana Ma, and Morillas Ruiz. 2012. "Análisis Nutricional de Alimentos Vegetales Con Diferentes Orígenes: Evaluación de Capacidad Antioxidante y Compuestos Fenólicos Totales Nutritional Analysis of Vegetable Food with Different Origins: Evaluation of Antioxidant Capacity and Phenolic Total Compounds". 32; 8-20.
- Manigandan, Krishnan, Richard L. Jayaraj, Kaliaperumal Jagatheesh, and Namasivayam Elangovan. 2015. "Taxifolin Mitigates Oxidative DNA Damage in Vitro and Protects Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryos against Cadmium Toxicity." 39; 1252–61.
- Mosquera, Ana Juleza, Nelly Yolima Sánchez, Paula Liliana, Galeano García, and Angelica Tamayo-Tenorio. 2009. "Propiedades Antioxidantes de Los Frutos de Agraz o Mortiño (*Vaccinium Meridionale* Swartz)." 93–112.
- Vanda, Henni, Yuntao Dai, Erica G. Wilson, Robert Verpoorte, and Young Hae Choi. 2018. "Green Solvents from Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents to Natural Deep Eutectic Solvents." 21; 628–38.

ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD DE LA FRUTA DE *SYNSEPALUM DULCIFICUM*

González Martos, Raquel¹; Menéndez Rey, Adrián¹; Quiroz Troncoso, Josefa²;
De Aramburu Lamas, María²

Tutores: Ramírez-Castillejo, Carmen¹; Bensadon-Naeder, Loan²

¹Dept. de Biología y Biotecnología Vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

²Medicinal Gardens S.L. Madrid

Correo electrónico (AUTORA): raquel.gonzalez@upm.es

RESUMEN

La fruta de *Synsepalum dulcificum* presenta en su pulpa una glicoproteína, la miraculina, la cual tiene la capacidad de convertir el sabor ácido en dulce. En la Unión Europea esta fruta está pendiente de aprobación para su consumo, por lo que se ha de demostrar su seguridad y toxicidad siguiendo lo estipulado en el Reglamento Europeo 2015/2283 de Nuevos Alimentos. Por dicho motivo, este trabajo se centra en el estudio de inmunogenicidad de diferentes fracciones liofilizadas de la fruta digeridas y no digeridas, con el fin de analizar la posible reacción alérgica que podría desencadenar y así minimizar al máximo reacciones adversas en sus consumidores. Los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación de linfocitos no muestran crecimiento de la población celular, ni revelan diferenciación hacia el fenotipo de linfocito B CD19+. Además, el ensayo de activación de basófilos sugiere que no se da la producción de IgE ni la desgranulación de los componentes inflamatorios, causantes de los síntomas de la alergia. En conclusión, en este estudio se muestra que el consumo de la fruta de *S. dulcificum* no está asociado con una respuesta alérgica; por lo que se cumple este requisito para permitir la comercialización de productos derivados de ella.

Palabras Clave: *Synsepalum dulcificum*, miraculina, estudio inmunogénico.

INTRODUCCIÓN

La fruta de la especie de origen africano *Synsepalum dulcificum* es un potencial nuevo alimento en Europa con interés comercial ya que presenta en su pulpa la glicoproteína miraculina, capaz de convertir la percepción del sabor ácido en dulce (Kurihara y Beidler, 1968). Para llevar a cabo su papel de modificador del sabor esta proteína se une inicialmente a los receptores del dulce sin activarlos, y es en el momento en el que ingerimos algo ácido cuando el pH de la cavidad bucal se acidifica y se produce un cambio conformacional en la cadena glicosídica de la proteína que termina activando a dichos receptores. Esto se traduce en que la percepción del sabor ácido de los alimentos se convierta en dulce, lo que permitiría desarrollar una nueva estrategia dietética natural que ayude a las personas con diabetes u obesidad a reducir la ingesta de azúcares y edulcorantes (Wilken y Satiroff, 2012).

La alergia es una enfermedad causada por una respuesta inmune a antígenos ambientales no microbianos. Se caracteriza por una significativa proliferación de linfocitos T colaboradores (Th), que producen Interleucina 4 (IL-4) y de linfocitos B, que expresan y secretan grandes cantidades de IgE tras la exposición a estas sustancias. En dicha reacción inmunogénica también se da la activación de los basófilos producida por la unión del alérgeno a los IgE anclados en su membrana. Esta interacción provoca la liberación del contenido de sus gránulos al exterior, una serie de mediadores proinflamatorios que son los que dan lugar a los correspondientes síntomas de la alergia (picazón de nariz y ojos, estornudos, obstrucción nasal, tos, opresión en el pecho, dificultad respiratoria) e incluso, en algunos casos, producen shock anafiláctico (Abul K. Abbas, 2013).

En la actualidad, las alergias alimentarias suponen un problema de salud debido a su gran incidencia y a sus molestos síntomas. Las empresas alimenticias deben cumplir determinados requisitos legales para la puesta en el mercado de nuevos productos

alimenticios que puedan ser susceptibles de desencadenar una respuesta inmune inesperada. Por ello, el objetivo de este trabajo es realizar un estudio inmunogénico sobre el nuevo alimento *S. dulcificum* que compruebe la ausencia/presencia de reacciones alérgicas, según se recoge en Reglamento UE 2015/2283.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar la posible reacción alérgica se realizaron dos tipos de ensayos *in vitro* para medir la posible proliferación de linfocitos y la activación de basófilos. Ambos se realizan con sangre periférica de individuos voluntarios. En el ensayo de proliferación de linfocitos, se llevó a cabo el aislamiento de células mononucleares por gradiente de Ficoll (GE Healthcare) (Beyum, 1977). Las células aisladas se sembraron en una placa de cultivo celular a una concentración de 200000 células/mL y se expusieron a diferentes fracciones liofilizadas de la fruta (10 µg/mL) que consistieron en la fruta con piel, sin piel y la miraculina purificada. Se consideraron fracciones digeridas *in vitro* y sin digerir. Como control positivo se utilizó una lectina de *Phaseolus vulgaris* (Sigma Aldrich), descrita como mitógeno. Se incubaron las muestras durante 6 días a 37 °C y 5 % de CO₂ y se llevó a cabo el recuento celular por citometría de flujo en el equipo MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec). Con el fin de diferenciar las distintas poblaciones de linfocitos también se realizó un marcaje inmunocitoquímico con varios anticuerpos (Abnova) unidos a fluoróforos: Anti-CD4+-PE (ficoeritrina) para distinguir células T colaboradoras, y Anti CD19+-APC (aloficocianina) para los linfocitos B.

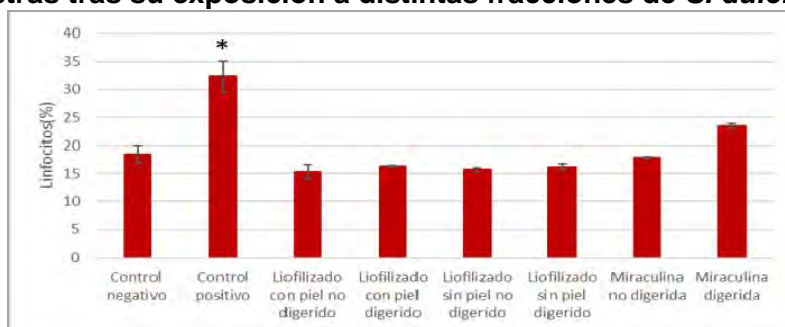
Por otro lado, el ensayo de activación de basófilos se realizó con sangre total, expuesta a las mismas muestras aplicadas en el ensayo de proliferación de linfocitos (10 µg/mL). Como control positivo se utilizó la misma concentración de anticuerpo anti-human IgE (Abnova), que es capaz de activar a los basófilos. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y tras esto se realizaron varios lavados con el fin de parar la reacción y lisar y eliminar los eritrocitos de la muestra. A continuación, se marcaron las células con el anticuerpo anti-CD63-FITC (Abnova), lo que nos permite analizar si se han activado los basófilos ya que esta proteína solo se expresa en la membrana tras la liberación de sus gránulos. Los resultados de inmunocitoquímica se obtuvieron por citometría de flujo.

El tratamiento de los datos se llevó a cabo mediante *Excel Statistics* y el análisis estadístico se realizó usando el test paramétrico T de Student y el no paramétrico, U de Mann-Whitney. Los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el ensayo de linfocitos muestran que no se produce un aumento en el porcentaje de linfocitos presentes en las distintas muestras y que los cambios no son significativos excepto en el caso del control positivo (PHA), como se esperaba por su carácter mitogénico (Figura 1).

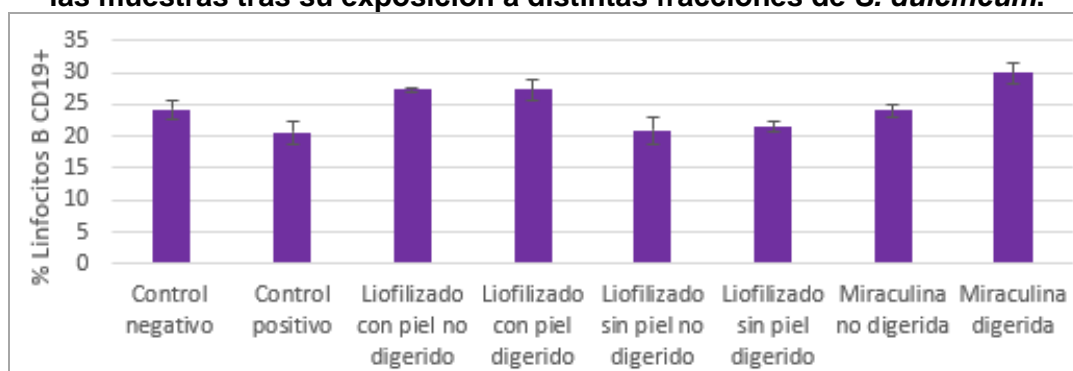
Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de linfocitos presentes en las muestras tras su exposición a distintas fracciones de *S. dulcificum*.



Estos resultados no concuerdan con el patrón de activación linfocitaria esperado para un alimento alergénico, ya que no existe proliferación celular como se describe en la alergia o hipersensibilidad inmediata tipo I (Abbas, 2013).

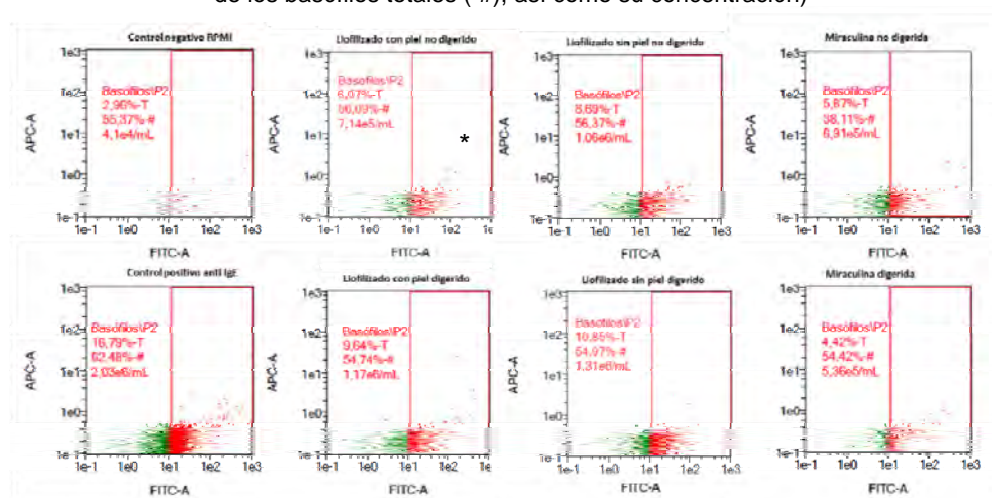
Por otro lado, tampoco se produce una activación de los linfocitos B, secretores de la inmunoglobulina E implicada en la reacción alérgica, ya que no se observa un cambio estadísticamente significativo en la población de linfocitos hacia el fenotipo celular CD19⁺, tal y como se puede observar en la figura 2.

Figura 2. Representación gráfica del porcentaje de linfocitos B CD19⁺ presentes en las muestras tras su exposición a distintas fracciones de *S. dulcificum*.



Además, en los ensayos realizados se pueden descartar otras funciones específicas de los linfocitos efectores relacionadas con la alergia. En la reacción alérgica, los linfocitos CD4⁺ Th normalmente producen un aumento en la expresión de anticuerpos IgE específicos, la posterior activación de los basófilos por unión de los IgE a los receptores Fc de su membrana y la desgranulación de estos. Dichos sucesos no ocurren en nuestros ensayos, ya que en el ensayo de basófilos (Figura 3) se puede ver que la exposición extracelular de CD63 se mantiene en niveles iguales al control negativo realizado y no se dan diferencias significativas con este. Por ello, se cree que no se ha producido la estimulación del cambio de isotipo a IgE, mediada por la IL-4 secretada por los linfocitos Th y no se está produciendo una reacción alérgica.

Figura 3. Resultados de citometría de flujo del ensayo de activación de basófilos tras su exposición a distintas fracciones, digeridas y sin digerir, del fruto de *S. dulcificum*. (Se incluye el porcentaje de basófilos totales en la muestra (-T) y el porcentaje de activados de los basófilos totales (-#), así como su concentración)



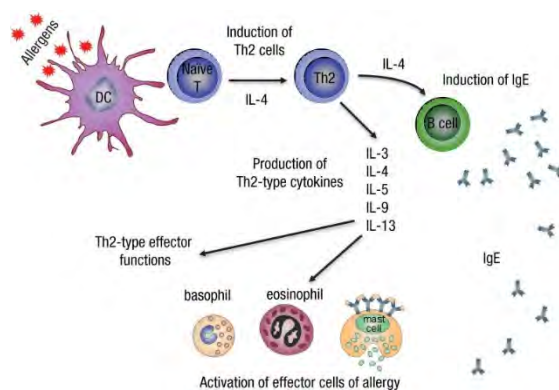
Sin embargo, se deben realizar estudios complementarios de las funciones efectoras de los linfocitos Th, que apoyen estos resultados preliminares. Se ha planteado la posibilidad de medir los niveles de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, que median las funciones realizadas por estas células como se ha descrito en distintos modelos (Kidd, 2003); o medir la cantidad de IgE circulante.

En cualquier caso, se puede emitir la hipótesis de que los síntomas de la alergia no se darían, ya que no ocurre la desgranulación (Figura 3) ni la liberación de interleucinas que inician la cascada de señalización de moléculas proinflamatorias que producen los exantemas cutáneos, la congestión sinusal o la constricción bronquial con dificultad respiratoria, incluidas en la sintomatología alérgica.

De esta forma mediante varios ensayos quedaría demostrado que la fruta de *S. dulcificum* y sus productos derivados no serían capaces de activar la cascada inmunogénica relacionada con las reacciones alérgicas incluida en la Figura 4.

Figura 4. Mecanismo celular y molecular de las reacciones alérgicas.

(Kucuksezer et al., 2013)



CONCLUSIONES

No existe proliferación significativa de linfocitos tras su exposición a las diferentes fracciones del fruto de *S. dulcificum* y no se observan cambios estadísticamente significativos en la población de linfocitos B CD19+, por lo que se descarta el desencadenamiento de una reacción alérgica. Además, no existen evidencias de activación en la población de basófilos por lo que se puede decir que no se dan los síntomas de la alergia.

AGRADECIMIENTOS

A todo nuestro grupo de investigación, por el apoyo otorgado y los ánimos en los momentos más duros. A nuestros tutores, por guiarnos en este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Abul K. Abbas, A. H. L. (2013). Inmunología celular y molecular. In Journal of Chemical Information and Modeling (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Beyum, A. (1977). Separation of Lymphocytes, Lymphocyte Subgroups and Monocytes: A Review. 10, 71–76.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Alternative Medicine Review, 8(3), 223–246.
- Kucuksezer, U. C., Ozdemir, C., Akdis, M., Akdis, C. A. (2013). Mechanisms of immune tolerance to allergens in children. Korean Journal of Pediatrics, 56(12), 505–513. <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.12.505>
- Kurihara, K., Beidler, L. M. (1968). Taste-Modifying Protein from Miracle Fruit. 1241–1243.
- Wilken, M. K., Satiroff, B. A. (2012). Pilot study of “miracle fruit” to improve food palatability for patients receiving chemotherapy. Clinical Journal of Oncology Nursing, 16(5), 173–178. <https://doi.org/10.1188/12.CJON.E173-E177>.

PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE LA GLICOPROTEINA DE *SYNSEPALUM DULCIFICUM*

De Aramburu- Lamas, María¹; González- Martos, Raquel¹; Menéndez-Rey, Adrián²
Tutores: Ramírez-Castillejo, Carmen¹

¹Dept. de Biotecnología y Biología vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid

² Medicinal Gardens. Baiafood

Correo electrónico (AUTORES): mariaaramburu23@gmail.com, raquel.gonzalez@upm.es,
adrian.menendez.rey@alumnos.upm.es

RESUMEN

La miraculina fue aislada por primera vez de la llamada baya mágica obtenida de *Synsepalum dulcificum*. Esta fruta crece en el oeste de África, principalmente en Ghana, y tiene la capacidad de modificar el sabor agrio de los alimentos, transformando la percepción del dulce. Las aplicaciones biotecnológicas en el campo de la salud son múltiples ya que supondría una ventaja para prevenir diversas enfermedades crónicas como pueden ser enfermedades cardiovasculares, obesidad o diabetes al reducir la ingesta de azúcares y edulcorantes. Además, permite a su vez el manejo de la disgeusia, un trastorno del gusto derivado de la quimioterapia y otros tratamientos, mejorando la palatabilidad de estos pacientes. Esta glicoproteína activa está constituida por dos polipéptidos unidos por un puente disulfuro, y la propiedad de modificación de sabor la adquiere cuando se encuentra en forma de dímero y no de monómero aislado. La expresión de la miraculina se ha estudiado en organismos como la lechuga y tomate transgénicos, entre otros, pero no en *Pichia pastoris*, una levadura utilizada habitualmente comovector de alta expresión y que posee múltiples ventajas. Por ello en el siguiente trabajo se explica el procedimiento necesario para extraer el gen de la miraculina y desarrollar un vector de alta expresión de esta proteína en *Pichia pastoris*.

Palabras clave: *Escherichia coli*, miraculina, proteína modificadora del sabor.

INTRODUCCION

***Synsepalum dulcificum*, baya mágica**

La fruta milagrosa o baya mágica, es el fruto de *Synsepalum dulcificum*, una planta indígena tropical que crece en el oeste de África. Esta fruta tiene la capacidad de transformar el sabor ácido en dulce y, por tanto, ha sido investigada para su uso como edulcorante natural o modificador del sabor, tapando los sabores ácidos y desagradables de ciertos alimentos (Rodrigues et al., 2016). La baya mágica crece en un arbusto de entre 6 y 15 pies de altura, perteneciente a la familia *Sapotaceae*, entre los meses de diciembre a junio (Inglett y Chen, 2011). Estas frutas pertenecen al grupo de frutos del bosque como los arándanos, moras, frambuesas y uvas, y presentan una forma elipsoide pequeña, de aproximadamente 2-3 cm de largo, con un color rojo brillante.

La fruta de *Synsepalum dulcificum* ha demostrado tener grandes cantidades de grupos fenólicos antioxidantes de gran importancia, que poseen funciones protectoras de la salud al prevenir diversas enfermedades crónicas como pueden ser enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cánceres (Shen et al., 2015). Además, al convertir la percepción del sabor ácido en dulce, esto también permite desarrollar una nueva estrategia dietética natural (Wilken y Satiroff, 2012).

Miraculina

El compuesto activo del fruto que actúa como modificador del sabor es la miraculina, una glucoproteína formada por una cadena polipeptídica, que tiene un peso molecular de 24,600kDa, y dos moléculas glucosídicas unidas a dos residuos de aminoácidos, Asn-42 y Asn-186 (Figura 1). La cadena de carbohidratos más frecuente en la miraculina es la N-acetilactosamina con xilosa, las cuales son específicas de plantas (Matsuyama et al.,

2009). Además, la miraculina también tiene 7 residuos de cisteína, los cuales forman 3 puentes disulfuro intramoleculares (Figura 2) y un dímero unido covalente por las Cys-138 de dos moléculas proteicas distintas. Este dímero es el que tiene actividad modificadora del sabor a pH ácido (Matsuyama et al., 2009).

Mecanismo de acción

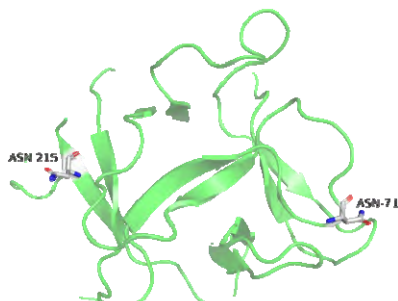


Figura 1: Sitios de glicosilación de la

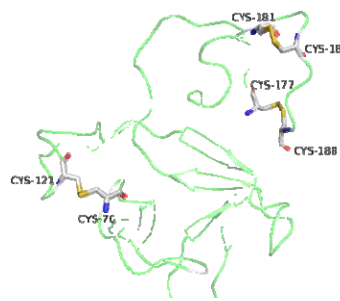


Figura 2: Puentes disulfuro intramoleculares

La miraculina, para actuar como modificador del sabor, se une a un sitio alostérico de los receptores del dulce presentes en la membrana de las células del sabor de la lengua (hT1R2-hT1R3). Estos receptores pertenecen al grupo de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs) y sufren un cambio conformacional en presencia de protones (H⁺), es decir, cuando se ingiere algo ácido. Esto permite la unión de las moléculas de azúcar presentes en la miraculina al sitio activo de los receptores del dulce provocando una sensación fuerte de dulzor, la cual dura hasta que la miraculina es diluida y eliminada por la saliva, tras 10-30 minutos. (Rodrigues et al., 2016)(Koizumi et al., 2011). La proteína miraculina por sí sola no tiene sabor, pero simula un sabor dulce hasta 400.000 veces mayor que la sacarosa.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Estudio del gen de la miraculina y del vector pPinkα - HC

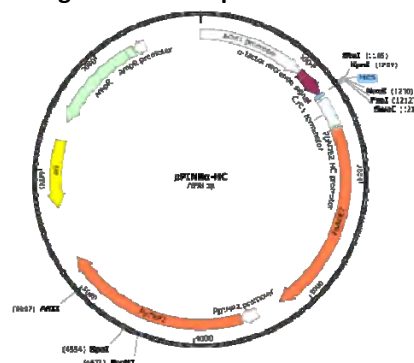
Para obtener información del gen de la miraculina del fruto de *Synsepalum dulcificum* se utilizó la base de datos EMBL-EBI.

Las características de la proteína se obtuvieron de la base de datos Uniprot, permitiéndonos saber que aminoácidos pertenecen a la secuencia señal y cuales a la proteína.

Una vez obtenida la secuencia génica de la miraculina se analizaron cuáles de las enzimas de restricción se podían utilizar en el proceso de clonación de nuestro gen de interés en el vector pPinkα-HC. Tras el análisis se eligió, la enzima Mly I para el extremo 5' del inserto y para el extremo 3', la enzima KpnI que inserta un residuo fosfato en el sitio de restricción tras el corte. Por otro lado, las enzimas utilizadas para la digestión del vector son, Stu I en el extremo 5' y Kpn I en el extremo 3'.

Una vez elegidas las enzimas, se comprobó que ninguna de ellas poseía un sitio de restricción dentro del gen mediante la generación de un mapa de enzimas de restricción en la secuencia del gen en la base de datos Nebcutter.

Figura 3: Vector pPinkα - HC



Obtención y caracterización de la proteína de interés

Extracción de ARN de *Synsepalum dulcificum*

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante RNeasy Plant mini kit. Antes de empezar el procedimiento se preparó el buffer de lisis LTC, al cual se añadieron 10 µl de β-Mercaptoetanol (β-ME) por cada ml de buffer.

El material de partida para la extracción del ARN de la fruta fueron 100 mg del puré de la baya congelados a -80°C y molidos. Fue importante no sobrepasar el límite de los 100 mg ya que hacerlo podría provocar una saturación de las columnas de extracción, una lisis incompleta y la interferencia en la unión del ARN a la columna, dando lugar a un menor rendimiento. A partir de aquí se continuó con el protocolo del kit RNeasy Plant mini (QIAGEN) y el pellet que contenía el material genético obtenido en la columna de extracción, se eluyó utilizando H₂O miliQ libre de ARNasas.

Cuantificación de ARN

Los distintos eluidos obtenidos en el paso anterior se analizaron en un espectrofotómetro de microplaca Epoch con una plataforma Take3 (Biotek). Esto permitió medir la concentración de ácidos nucleicos y la cantidad de ARN que contenían. Se midió la ratio 260/280 nm, de 2 µl de cada una de las muestras por replicado. También se comprobó la presencia de ARN en un gel de agarosa.

Obtención de cDNA de la miraculina

El ARN obtenido debe retrotranscribirse a cDNA para introducirlo para digerirlo e introducirlo en el vector de expresión. La retrotranscripción se llevó a cabo mediante la enzima *Bitools high retrotranscriptase*, en un vial que contenía 2 µg de extracto de ARN como material de partida, 0,1mM dNTP, 7,5 U de retrotranscriptasa, 5 µl de buffer, 25 pmol de oligosdT. Este mix se incubó a 42 °C durante 1 h seguido por un minuto a 70°C para inactivar la retrotranscriptasa. (Oliveira De Paula et al., 2002). Los cebadores u oligosdT se sintetizaron específicamente según la secuencia de la miraculina.

El cDNA de la miraculina obtenido se amplificó utilizando la técnica de PCR a tiempo final, en la que se utilizó la PFU polimerasa para la replicación, para así evitar errores en la síntesis de los transcritos. Los *primers* o cebadores utilizados en esta amplificación se diseñaron introduciéndoles los sitios de restricción para las enzimas Stu I (forward), y el Kpn I (reverse) para así posteriormente poder introducirlo en el vector de expresión.

También se analizó la temperatura de corte más adecuada en la base de datos *Eurofins genomics* para así diseñar el cebador más adecuado. La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 3 µl de cDNA, 0,1 Mm of dNTP, 1U de PFU polimerasa, 5µl de buffer 10X (200Mm Tris-HCl (pH:8,4), 500mM KCl) y 50 pmol de los primers sintetizados. (Oliveira De Paula et al., 2002). La reacción de amplificación consiste en una etapa de desnaturalización inicial que se lleva a cabo a 94°C durante 2 minutos, seguido por un proceso de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización: 94°C durante 15 segundos; anillamiento de primers: 60°C durante 30s; y la extensión: 68°C durante 1 minuto) y por último la extensión final a 68°C durante 7 minutos. (Matsuyama et al., 2009) Los amplicones obtenidos fueron detectados mediante electroforesis en un gel de agarosa, teñido con Gelred.

Ligación gen-pPinka

Para introducir el gen en el vector pPinka-HC, este se digirió inicialmente mediante la adición en un eppendorf del vector, el buffer de restricción 10X, las enzimas de restricción Stu I y Kpn I y agua miliQ, obteniendo como resultado un vector linearizado tras ser incubado en este medio de reacción *overnight* a 16 °C.

Una vez digerido el vector y linealizado se comprobó en gel de agarosa el rendimiento de la reacción de digestión. Posteriormente se insertó el gen de miraculina (amplicones obtenidos en el proceso de PCR) en el vector utilizando la T4 DNA Ligase. La reacción de ligación se llevó a cabo en un tubo de microcentrífuga en el que se mezcló el buffer de ligación 5X, la T4 ADN ligasa, el vector pPink α -HC digerido, el gen de la miraculina y H₂O destilada. Esto se centrifugó brevemente y se incubó a 16°C *overnight*, obteniendo el vector con el gen clonado

CONCLUSIONES

Los pasos realizados en este procedimiento experimental nos permiten obtener ARN del fruto de *S. dulcificum*, para así, mediante retrotranscripción específica obtener el cDNA del gen de la proteína miraculina. El cDNA del gen de la miraculina se amplifica y se introduce en un vector de expresión apto para *Pichia pastoris* mediante ligación. La posterior introducción de este vector en la levadura por electroporación nos permitirá expresar la miraculina de forma transgénica, purificarla y disponer de ella para poder realizar otros estudios de actividad y aplicación. Por ello, se concluye que en este trabajo se han realizado los procedimientos iniciales para obtener la miraculina transgénica expresada en *Pichia Pastoris*.

BIBLIOGRAFÍA

- Inglett, G. E., & Chen, D. (2011). Contents of phenolics and flavonoids and antioxidant activities in skin, pulp, and seeds of miracle fruit. *Journal of Food Science*, 76(3), 479–482. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02106.x>
- Koizumi, A., Tsuchiya, A., Nakajima, K. I., Ito, K., Terada, T., Shimizu-Ibuka, A., Briand, L., Asakura, T., Misaka, T., & Abe, K. (2011). Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16819–16824. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016644108>
- Matsuyama, T., Satoh, M., Nakata, R., Aoyama, T., & Inoue, H. (2009). Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 145(4), 445–450. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn184>
- Oliveira De Paula, S., Pires Neto, R. J., Tocantins Correa, J. A. C., Assumpção, S. R., Costa, M. L. S., Lima, D. M., & Lopes Fonseca, B. (2002). The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. In *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE* (Vol. 96).
- Pope, B., & Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 24(3), 536–537. <https://doi.org/10.1093/nar/24.3.536>
- Rodrigues, J. F., Andrade, R. da S., Bastos, S. C., Coelho, S. B., & Pinheiro, A. C. M. (2016). Miracle fruit: An alternative sugar substitute in sour beverages. *Appetite*, 107, 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.09.014>
- Shen, Y., Prinyawiwatkul, W., Du, L., Zhang, X., & Xu, Z. (2015). miracle fruit Statistical and Technical Methodologies of Replicated Sensory Ranking Tests View project Properties of starch View project Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.072>
- Takahashi, N., Hitotsuya, H., Hanzawa, H., Aratall, Y., & Kurihara, Y. (n.d.). Structural Study of Asparagine-linked Oligosaccharide Moiety of Taste-modifying Protein, Miraculin*. In *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (Vol. 265, Issue 14).
- Wilken, M. K., & Satiroff, B. A. (2012). Pilot study of “miracle fruit” to improve food palatability for patients receiving chemotherapy. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 16(5), 173–178. <https://doi.org/10.1188/12.CJON.E173-E177>.

NOVEL APPROACHES TO ASSESS ANTIBODY RESPONSES AGAINST INFLUENZA VIRUS IN HUMAN POLYCLONAL SERUM SAMPLES: INFECTION vs. VACCINATION

Escalera Merino, Alba

Tutors: García-Sastre, Adolfo^{1,2}; Aydillo-Gómez, Teresa^{1,2}

¹Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York

²Global Health and Emerging Pathogens Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York

Correo electrónico (AUTORA): alba.escalera@alumnos.upm.es

ABSTRACT

The immunogenicity of current influenza virus vaccines is assessed by hemagglutination inhibition assay, the only correlate of protection widely accepted by regulatory agencies. However, hemagglutination inhibition titers do not always accurately predict protection against influenza virus. Recent research has suggested the potential role of antibodies against the stalk domain of the hemagglutinin (HA) influenza protein and neuraminidase (NA) influenza protein and antibodies with effector activities such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) in protection from influenza infection. In this study, we used human serum samples of solid organ transplant recipients (SOTR) to characterize the NA-based immunity, and ADCC and ADCP antibody responses against the HA (stalk and full-length) and NA protein of influenza A H1N1pdm09 virus after infection and seasonal vaccination with the trivalent inactivated vaccine (TIV). We found that TIV vaccination induced antibodies that inhibit NA activity while natural infection not. However, we observed that ADCC antibody responses against H1 and N1 were highly induced by infection compared to TIV vaccination. To measure ADCP antibody responses, we determined that the optimal approach was using A549 cells due to the unspecific antibody-mediated signal observed in MDCK cells. In conclusion, this study improves our knowledge about the humoral immune response induced by influenza virus infection and vaccination in order to identify new surrogate markers of protection and develop a universal influenza vaccine.

Keywords: ADCC, correlate of protection, universal influenza vaccine

INTRODUCTION

Influenza virus is one of the most common respiratory viruses in the population, causing a significant public health and economic burden worldwide. The HA is the most antigenically influenza virus protein and it is composed of an immunodominant head domain and an immunosubdominant and highly conserved stalk domain among influenza viruses. Immune antibody responses mainly target the head of the HA and are measured by hemagglutination inhibition assay (HAI). Although seroprotection is considered when neutralizing titers measured by HAI are ≥ 40 , some studies have demonstrated that these antibodies can failed to confer protection. In contrast, antibodies against the conserved HA stalk domain have shown potent neutralizing activity and strategies to develop a 'one shot' universal influenza vaccine are focusing on eliciting these broadly neutralizing HA stalk antibodies. The second influenza virus glycoprotein is NA. Importantly, it has been shown that antibodies that inhibit neuraminidase activity can correlate with protection and reduce influenza virus disease in humans. In addition, antibodies against HA and NA might have effector activities mediated by the Fc receptor (FcR) such as ADCC and ADCP. ADCC is mediated by the engagement of Fc γ R1IIa on natural killer cells causing the apoptosis of the infected cell. In contrast, ADCP is mediated by phagocytes through Fc γ R1IIa and results in the phagocytosis of opsonized pathogens and infected cells after formation of immune complexes (antigen-antibody complex). Remarkably, these mechanisms have been associated with protection against influenza virus infection. Therefore, further research is needed to understand the potential protective role of

antibody-mediated functions and NA-based immunity against influenza virus in order to identify new correlates of protection and contribute to the development of a universal influenza virus vaccine.

MATERIALS AND METHODS

Human serum samples: serum samples from SOTR patients with pandemic H1N1 influenza virus infection or TIV vaccination were collected at the onset of the symptoms or pre-TIV vaccination and at the convalescence (28 days later) or post-TIV respectively, during three consecutive influenza epidemic seasons from 2010 to 2013. At the end, we had access to 40 infected SOTR (80 serum samples), 19 TIV-vaccinated SOTR (38 serum samples) and 9 uninfected SOTR (9 serum samples only collected at the onset of the symptoms) that we used as a control. **Cell lines:** MDCK and A549 cells stably expressing cH6/1 chimeric HA (H6 head domain [H6N1 virus A/mallard/Sweden/ 81/02] in combination with an H1 stalk domain [H1N1 A/California/7/2009]), full-length H1 HA (H1N1 A/California/7/2009) and N1 NA (H1N1 A/California/7/2009) were generated by transfection of the pCAGGS plasmid encoding for each protein and selection by hygromycin and immunofluorescence assay. **Enzyme-linked lectin assay (ELLA):** In brief, Immulon 4 HBX 96-well plates were coated with 100 μ l fetuin (25 μ g/ml) diluted in PBS and incubated at 4°C overnight. The following day RDE-treated SOTR human serum samples (starting concentration of 1:40) were serially diluted 1:2 in PBS in a separate 96-well plate, resulting in a final volume of 75 μ l /well. H6N1 virus stock was then diluted 1:16 in PBS (optimal dilution previously calculated for our assay). Diluted virus (75 μ l/well) was then added to the serum plates and incubated at RT for 90 min. In the meantime, fetuin-coated plates were washed six times with 250 μ l PBS containing 0.1% Tween 20 (T-PBS), blocked with 200 μ l PBS-5% BSA for 1 h RT and then washed again six times with 250 μ l T-PBS. One hundred-microliter of serum-virus mixture was added and incubated for 2 h at 37°C. The plates were washed six times with T-PBS, and PNA conjugated to HRP (50 μ l/well at 0.5 μ g/ml diluted in PBS) was added for 1 hour at RT in the dark. Then, plates were washed again six times with 250 μ l T-PBS, and 50 μ l of TMBE was added to all wells for development. The reaction was stopped after 30 min by adding 50 μ l of 2 M H₂SO₄ to all wells. The plates were read at an absorbance of 450 nm with a Synergy H1 hybrid multimode microplate reader (BioTek). Then, we calculated the neuraminidase inhibition activity of our SOTR human serum samples as the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) titers by GraphPad Prism. **ADCC and ADCP assays** were performed using ADCC and ADCP Reporter Bioassay kits (Promega) with modifications. Recombinant MDCK cell lines expressing the antigen of interest were seeded in white flat bottom polystyrene 96-well plates at a density of 3.5×10^4 cells/well. On the day of assay, cells were washed with Opti-MEM and once removed, 25 μ l of RPMI 1640 was added to each well. In a separate 96-well plate, non-RDE-treated human serum samples were serially diluted 2-fold in RPMI 1640 medium with a starting concentration of 1:25 and 25 μ l of diluted serum was added to the cells. ADCC and ADCP effector cells were diluted to 7×10^4 cells/ml in RPMI 1640 medium and added to the wells. After 6 h incubation at 37°C, 75 μ l/well Bio-Glo luciferase assay reagent was added, and luminescence was measured using a Synergy H1 hybrid multimode microplate reader (BioTek). Values were used for area under the curve (AUC) calculation using GraphPad Prism. All **statistical analysis** was performed using GraphPad Prism. To compare paired samples across time points (at baseline and 28 days post- infection and vaccination) the non-parametric Wilcoxon Rank t test was performed.

RESULTS AND DISCUSSION

First, we determined the neuraminidase inhibition (NI) activity (against N1Cal09 protein) of the SOTRs serum samples in an enzyme-linked lectin (ELLA) assay. This assay measures functional inhibition of the neuraminidase activity of an influenza virus by antibodies (Fig.1.A). To avoid unspecific signal mediated by antibodies against the HA protein, we used a recombinant H6N1 influenza virus. This virus expresses an exotic HA

(H6) from avian origin to which humans should not have pre-existing immunity, and the targeted N1, the NA from the strain (H1N1Cal09-like) that circulated during the seasons when SOTRs were enrolled. We observed that induction of NA inhibiting antibodies was significantly higher after influenza TIV-vaccination than infection (Fig.1.B). In contrast, our previous ELISA experiments showed that *de novo* anti-NA antibodies significantly increased after influenza infection (data not shown). However, this could be explained due to the different readouts that these assays measure: while ELISA only measure antigen binding, ELLA can inform whether these antibodies are functional.

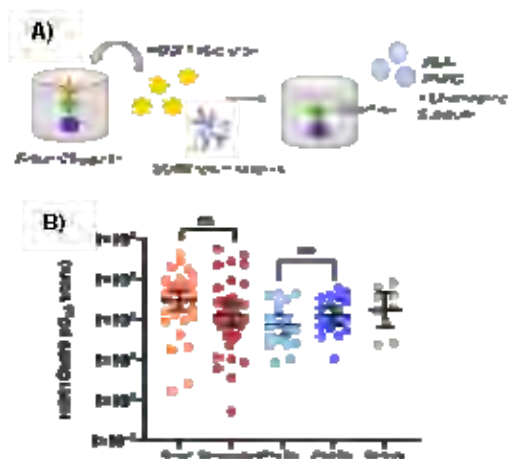


Figure 1. Characterization of neuraminidase inhibition activity against H6N1Cal09 virus in SOTR serum samples using an ELLA assay. **A)** Principle of ELLA assay: NA cleaves terminal sialic acid from fetuin glycoprotein. This NA activity can be quantified by measuring the amount of galactose that is at the terminus of the fetuin using a peroxidase-conjugated peanut-agglutinin (PNA-HRPO), a lectin with specificity for terminal galactose. Then, a substrate for peroxidase is added, leading to a colorimetric change proportional to NA activity. **B)** IC_{50} (50% inhibitory concentration) titers of the human SOTR serum samples at the Onset (orange); Convalescent (red); Pre-TIV (light blue); Post-TIV (dark blue); Controls (grey). Bars represent geometric mean titers (GMT). Wilcoxon Rank test was performed to analyze statistical differences between the groups. (****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant).

Next, we measured antibodies with ADCC activity induced after influenza virus infection and vaccination by a commercial ADCC bioassay (Fig.2.A).

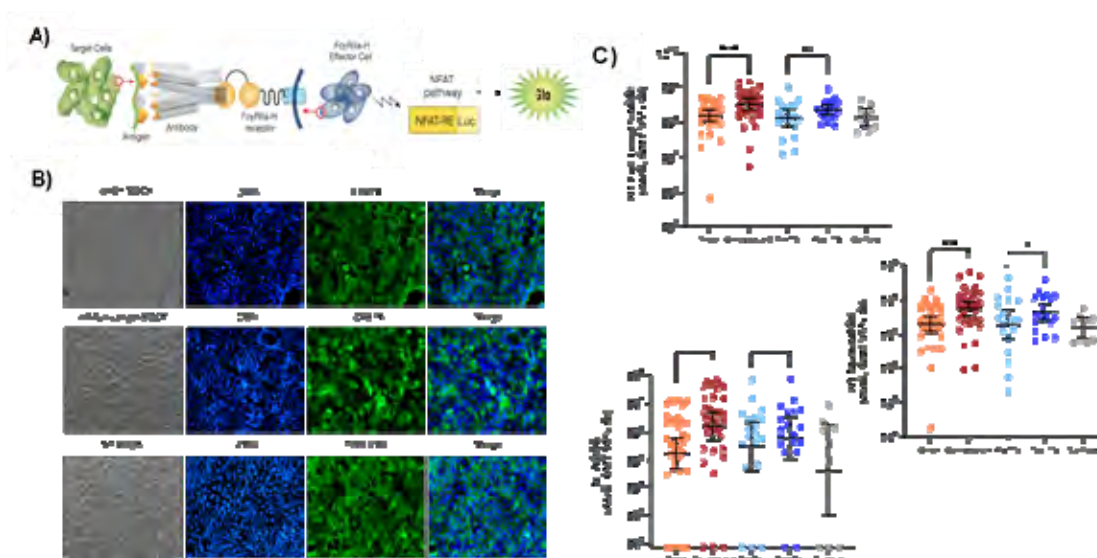


Figure 2. Characterization of ADCC activity in SOTR serum samples. **A)** Principle of ADCC assay: antibodies recognize an antigen on target cells and bind by its Fab domain. ADCP Effector Cells expressing Fc γ RIIIa bind to the Fc region of the antibody. These cells are engineering to have the luciferase gene couple to the NFAT transcription factor. The engagement target cell-antibody-effector cell activates NFAT and luciferase can be measured. **B)** IF assays in recombinant MDCK cell lines expressing the chimeric cH6/1, H1Cal09 and N1Cal09 proteins. Cells were stained with human monoclonal antibodies CR9114 (H1) or 1000-3C05 (N1) and counterstained with DAPI to visualize the nuclei. **C)** Area Under the Curve (AUC) symbols are shown at the Onset (orange), Convalescent (red); Pre-TIV (light blue), Post-TIV (dark blue); Controls (grey). Bars represent GMT. Wilcoxon Rank test was performed to analyze statistical differences between the groups. (****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant).

To mimic influenza infection *in vivo*, where HA and NA are expressed on the surface of infected cells, we used as target cells recombinant MDCK cell lines stably expressing N1Cal09 protein to measure antibody responses against N1, full length H1Cal09 protein to assess the antibody response against H1 head and stalk and the chimeric cH6/1 construct to measure the H1 stalk specific antibody response. We verified the expression of these antigens on the surface of the MDCK by an immunofluorescence (IF) assay (Fig.2.B). After determined the optimal conditions for our assay, we evaluated the antibody ADCC responses of the SOTR serum sample cohort. Results showed that H1 specific-stalk and full-length and N1 antibodies with ADCC activity were induced at higher levels after infection than after TIV-vaccination (Fig.2.C). Contrary to expected, TIV-vaccine was also able to induce N1 antibodies with ADCC activity despite the low content of NA seasonal influenza virus vaccines.

Finally, we aimed to investigate whether our human serum samples have influenza-specific antibodies capable of inducing ADCP function by using an ADCP bioassay (Fig.3.A). We followed the same approach as the one described for the ADCC assay. However, we observed unspecific signal in more than 50% of the serum samples with our target cells (wt MDCK) in the absence of the antigen of interest and thus, making unfeasible to use MDCK as target cells for the following experiments (Fig.3.B). We then hypothesized that unspecific signal could be overcome by using cells for human origin such as A549. We observed no unspecific signal in the ADCP bioassay in the absence of the antigen of interest suggesting that A549 cells could be an optimal proxy to assess antibody-mediated phagocytosis *in vitro* (Fig.3.C). Thus, we generated recombinant A549 cell lines stably expressing cH6/1, H1Cal09 and N1Cal09 proteins (Fig.3.D). However, we could not obtain any cH6/1-A549 cell clones suggesting the inability of A549 cells to support a stable expression of HA chimeric proteins.

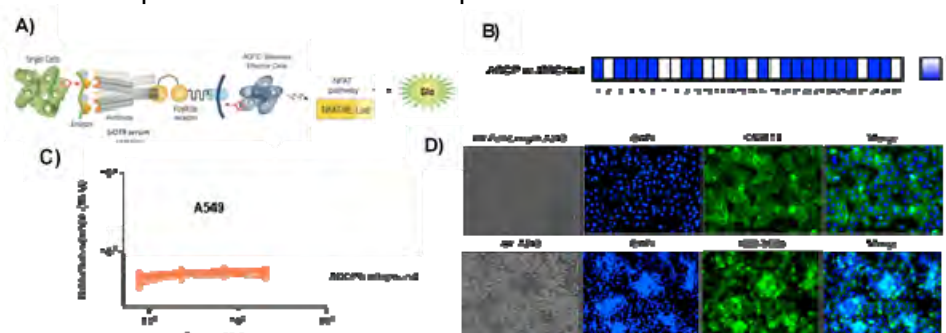


Figure 3. Optimization of ADCP assay in SOTR serum samples. **A)** Principle of ADCP assay: antibodies recognize an antigen on target cells and bind by its Fab domain. ADCP Effector Cells expressing FcγRIIIa-H131 bind to the Fc region of the antibody. These cells are engineering to have the luciferase gene couple to the NFAT transcription factor. The engagement target cell- antibody-effector cell activates NFAT and luciferase can be measured. **B)** Crossreactivity of ADCP Effector Cells in MDCK wt is shown as a scale 0 (No crossreactivity), 1 (Crossreactivity) for vaccinated and control SOTR serum samples. Below numbers show number of patients following an internal code. **C)** Absence of unspecific signal between SOTR serum samples and A549 cells in ADCP assay. Dotted line indicates background caused by ADCP effector cells. Bioluminescence measured as relative luminescence units (RLU) is plotted in the y axis for the different serum dilutions plotted in the x axis. **D)** IF assays in recombinant A549 cell lines expressing H1Cal09 and N1Cal09 proteins. Cells were stained with human monoclonal antibodies CR9114 (H1) and 1000-3C05 (N1) and counterstained with DAPI.

CONCLUSIONS: 1. TIV vaccination induced high titers of antibodies capable of inhibiting neuraminidase activity than natural infection when measured by ELLA assay. 2. Natural influenza H1N1 infection induced higher levels of anti- H1 stalk, H1 Full Length and N1 antibodies with ADCC activity than influenza TIV vaccination. 3. ADCP assays showed unspecific signal due to crossreactivity with MDCK wild type cell line.

REFERENCES: Aydiillo, T., Escalera, A. *et al.*, 2020 (under review in *Cell Host Microbe*). Krammer, F. 2019. *Nat. Rev. Immunol.*, 19: 383–397. Memoli, M. J. *et al.* 2016. *mBio*, 7: e00417-16

CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN EL ACEITE AROMAS DEL SEGURA

Esteban-Barroso, Alex¹; De Aramburu-Lamas, María²; González-Martos, Raquel¹; Quiroz-Troncoso, Josefa¹

Tutores: Ramírez-Castillejo, Carmen ¹

¹Dept. de Biotecnología y Biología Vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid.

²Aromas del Segura S.L. (Albacete)

Correo electrónico (AUTOR): alex.estebanb@alumnos.upm.es

RESUMEN

Los beneficios del aceite de oliva para la salud se atribuyen en gran parte a la capacidad antioxidante de los polifenoles. Por ello, es de gran importancia su análisis en los aceites. La cantidad de polifenoles en el aceite de oliva varía en función de varios aspectos, como puede ser el tipo de cosecha, el modo de procesamiento o el almacenamiento de productos, entre otros; y, por ende, su valor puede variar en cada caso. Los resultados obtenidos de polifenoles totales en este estudio validan la metodología empleada para cuantificarlos y nos dan la posibilidad de comparar el aceite virgen extra “Aromas del Segura” con otros valores de referencia. Esto permite caracterizarlo como un aceite con gran cantidad de polifenoles totales, encontrándose entre el primer y cuarto lugar de las siete variedades más comunes encontradas en España con alto contenido polifenólico.

Palabras clave: aceite de oliva, polifenoles, Folin-Ciocalteu

INTRODUCCION

El aceite de oliva es un producto que se obtiene de la aceituna, siendo ésta el fruto del olivo (*Olea europaea*). Este producto presenta unas características específicas según el ambiente geográfico y el clima en el que se haya cultivado, siendo las condiciones de la Sierra del Segura (Albacete) y el clima mediterráneo, factores que permiten obtener un aceite de oliva virgen extra de gran calidad.

Para garantizar dicha calidad en el aceite y, así, evitar situaciones fraudulentas, se han desarrollado diferentes técnicas tales como el análisis del perfil de triglicéridos, empleando un MALDI-TOF/MS (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*); o el estudio de la cantidad de ácidos grasos, utilizando cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas (GC-MS) o espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) combinado con quimiometría (Peršurić et al., 2018). Por otro lado, en el aceite de oliva existen otros compuestos presentes de forma minoritaria que nos permiten caracterizarlo de forma más exhaustiva. Uno de ellos, de gran relevancia en la calidad del aceite obtenido, son los polifenoles sintetizados por la planta como metabolitos secundarios para defenderse de hongos, insectos y bacterias (Stefani y Rigacci, 2014). Entre ellos destacan los flavonoles, los lignanos iridoides, y sus glucósidos.

Los polifenoles, además tienen un gran interés nutricional debido a su capacidad para interactuar con moléculas reguladoras, lo que les permite modular una serie de rutas señaladoras que mantienen la proteostasis, la homeostasis metabólica y el potencial redox, restaurando las condiciones de desequilibrio que puedan surgir (Leri et al., 2020).

El objetivo de este proyecto es cuantificar la cantidad de polifenoles totales presentes en varias muestras del aceite virgen extra “Aromas del Segura”, comparándolo con otros, utilizados como control: el aceite de oliva “Hacendado” de las variedades Arbequina y Hojiblanca, cuyo perfil polifenólico está asociado a un aceite de gran calidad; y el aceite de oliva “Valdezarza”, utilizado en la cafetería de la ETSIAAB. De esta forma se podrá caracterizar la calidad y las posibles propiedades beneficiosas del aceite de oliva virgen extra “Aromas del Segura”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Las muestras analizadas en este estudio fueron: 1) aceite de oliva virgen extra “Aromas del Segura”, procedente de dos depósitos distintos de la almazara (Depósito 5 y Depósito 6), para comprobar si existen diferencias entre ellos, 2) aceite de oliva “Hacendado” de las variedades Arbequina y Hojiblanca, y 3) aceite de oliva “Valdezarza”.

Para llevar a cabo la extracción de los polifenoles fue necesario hacer pasar las muestras de aceite de oliva a través de un embudo de 4 cm de diámetro con papel de filtro al que se le añadieron 20 g de sulfato sódico, con el fin de obtener aceite de oliva anhidro.

A continuación, se pesaron 2 g de cada uno de los aceites de oliva anhidro en un tubo Falcon de 15 ml y se agitaron durante 30 segundos empleando un vórtex.

Extracción de polifenoles

Para llevar a cabo la extracción de polifenoles de las distintas muestras de aceite se añadieron a cada uno de los tubos Falcon, 5ml de una solución de metanol:H₂O en una proporción 80:20. Posteriormente, la disolución se volvió a agitar en el vórtex durante 1 minuto (Escobar Salgado, 2010).

Cada una de las mezclas se sumergieron en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos manteniéndolo a temperatura ambiente y a continuación, se llevó a cabo una centrifugación a 2800 g durante 30 minutos.

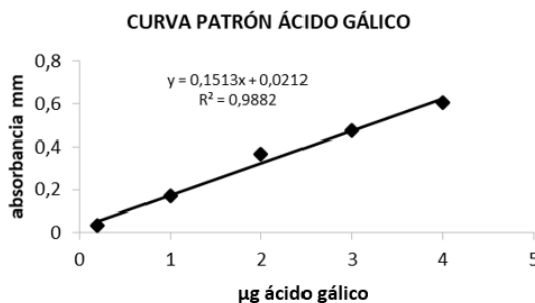
En último lugar, se tomó una alícuota de los sobrenadantes obtenidos y se filtraron a través de un filtro PES de 0,45µm y una jeringa de plástico de 5ml (Escobar Salgado, 2010).

Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales presente en las distintas muestras de aceite de oliva se determinó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, el cual está basado en una reacción de oxidación-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin- Ciocalteu, el cual oxida los compuestos fenólicos en un medio alcalino y este es reducido por acción de los polifenoles dando lugar a la formación de óxidos de color azul. La coloración azul producida posee una absorbancia de alrededor 770 nm. Este método no es específico ya que puede haber presentes distintas sustancias capaces de reducir el reactivo de Folin, de manera que nuestros resultados podrían verse afectados (Gracia Nava, 2006). Aun así, es un método bastante fiable.

Para realizarlo, en primer lugar, se preparó una recta patrón utilizando una solución estándar de ácido gálico (1 mg/ml) de la cual se tomaron concentraciones desde 1µg/ml (para lo cual se calcula que se necesitan 0,5 µl de ácido gálico) hasta 35 µg/ml. La recta obtenida se incluye en la Figura 1. En este área se consideran aceptables valores del coeficiente de determinación (R²) superiores a 0,97, y por ende, se puede utilizar el modelo para la interpolación de los datos y así obtener mg de ácido gálico/kg de muestra de los diferentes aceites.

Figura 1. Curva de calibración elaborada con ácido gálico



De las muestras de aceite disponibles se realizaron varias diluciones (1:10, 1:100) y 3 réplicas independientes de extracción y cuantificación, excepto del aceite “Aromas del Segura” depósito 6, del cual se realizaron 4 réplicas debido a las diferencias observadas

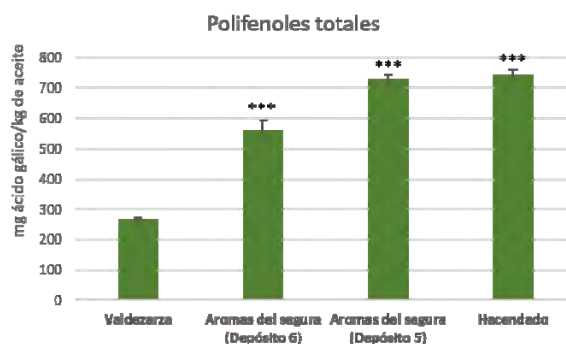
en los resultados obtenidos. 200 μL tanto de las distintas muestras, como de las diluciones que conforman la recta patrón se introdujeron en una placa de 96 pocillos. Los resultados obtenidos corresponden a la media de las réplicas realizadas.

La reacción colorimétrica del método se llevó a cabo mediante la adición de 10 μL de reactivo de Folín y la incubación durante 15 minutos en oscuridad. Una vez pasado este tiempo se añadieron 30 μl de carbonato sódico (NaHCO_3), y se realizó una nueva incubación de 2 horas. Finalmente se midió la absorbancia a 770nm (Ivanova et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de polifenoles totales oscilaron entre 265 y 743 mg de ácido gálico/kg de aceite. Los valores más bajos correspondieron al aceite “Valdezarza” y los más altos al aceite “Hacendado”. La concentración de polifenoles obtenida en las distintas réplicas fue más variable en el aceite Aromas del Segura, con diferencias acusadas entre sus distintos depósitos. Esto nos indica que el contenido en polifenoles totales varía dependiendo de la procedencia del aceite, la variedad e incluso la forma de almacenamiento. Los datos se muestran representados en la Figura 2.

Figura 2: Representación de la cantidad de polifenoles totales en los aceites Hacendado, Aromas del Segura (depósito n°5 y depósito n°6) y Valdezarza.



(El análisis estadístico se realizó frente al control aceite Valdezarza usando la prueba de t de Student con los siguientes niveles de significación: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***)).

Con respecto al aceite “Valdezarza” utilizado como control, tanto el aceite “Aromas del Segura” como “Hacendado” tienen una significativa mayor cantidad de polifenoles. Sin embargo, la cantidad de polifenoles obtenidos en el aceite “Hacendado” es mayor si lo comparamos con el depósito n°6, mientras que comparado con el depósito n°5 tiene una concentración similar.

Los valores en la cuantificación de polifenoles totales en el aceite de oliva se analizan en función a valores de referencia de polifenoles totales en diferentes tipos de aceites (Oliveras, 2005), tal y como se incluye en la Tabla 1.

Tabla 1: Comparación de la cantidad de polifenoles totales obtenidos en los aceites Aromas del Segura (depósito n°5 y depósito n°6) con otros valores de referencia.

	TIPO DE ACEITE (VARIEDAD)	mg de ácido gálico / kg de muestra
1	AROMAS DEL SEGURA DEP 5	729
2	PICUAL	693
3	COUPAGE	567
4	AROMAS DEL SEGURA DEP 6	561
5	HOJIBLANCA	537
6	LECHIN	518
7	ARBEQUINA	450
8	ACEITES MAS MADURO Y ECONÓMICOS	300-500

Según los resultados, el aceite de oliva virgen extra “Aromas del Segura” se encuentra entre el primer y cuarto lugar de las siete variedades más comunes encontradas en España.

Por otro lado, los valores obtenidos corroboran que determinadas variedades de olivo, como picual u hojiblanca, tienen predisposición genética a producir más polifenoles, lo explica que el aceite utilizado como control “Hacendado”, obtenido a partir de la mezcla de aceite de las variedades Arbequina y Hojiblanca tenga un mayor contenido en polifenoles totales.

Por último, cabe destacar que el Ministerio de Sanidad mediante el Reglamento UE nº 432/2012 de la Comisión Europea de 16 de mayo de 2012 permite añadir en las etiquetas «Los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo»; si es que existe una concentración de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados por 20 g de aceite, es decir, en un ensayo preliminar de polifenoles se debe obtener como mínimo 250 mg/kg. Según lo declarado anteriormente el aceite “Aromas Del Segura” podría ser candidato para poner en sus etiquetas el texto mencionado.

CONCLUSIONES

Se concluye que el aceite virgen extra “Aromas del Segura” contiene una gran cantidad de polifenoles totales en comparación con otros valores de referencia obtenidos para diferentes variedades de aceite, al igual que el aceite “Hacendado” obtenido de la mezcla de las variedades Arbequina y Hojiblanca. Sin embargo, cabe destacar que los valores obtenidos para el aceite “Aromas del Segura” varían según el procesamiento del aceite y el almacenamiento en depósito de los productos obtenidos. Aun así, se permitiría el etiquetado destacando las propiedades beneficiosas de su consumo.

AGRADECIMIENTOS

A todo nuestro grupo de investigación, por el apoyo otorgado y los ánimos en los momentos más duros. A nuestra tutora; y a la empresa Aromas del Segura, por su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

- Escobar Salgado, P. A. (2010). *Validación y desarrollo de una metodología analítica para la determinación de polifenoles totales en aceites*.
- Gracia Nava, M. A. (2006). Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales. *Universidad Autonoma de Querétaro*, 1–4. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200015>
- Ivanova, V., Stefova, M., & Chinnici, F. (2010). Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J. Serb. Chem. Soc*, 75(1), 45–59. <https://doi.org/10.2298/JSC1001045I>
- Manuela Leri, Maria Scuto, Maria Laura Ontario, Vittorio Calabrese, Edward J. Calabrese 4, M. B. (2020). Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Science*.
- Oliveras, M. J. (2005). *CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA . MEMORIA presentada por MARÍA JESÚS OLIVERAS LÓPEZ para. 300*. <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/746/15519387.pdf;jsessionid=DF255BD9DAD6BEF7DECE23F0B5381370?sequence=1>
- Peršurić Ž, Saftić L, Mašek T, P. S. (2018). Comparison of triacylglycerol analysis by MALDI-TOF/MS, fatty acid analysis by GC-MS and non-selective analysis by NIRS in combination with chemometrics for determination of extra virgin olive oil geographical origin. *LWT*, 95, 326–332.
- Stefani, M.; Rigacci, S. (2014). Beneficial properties of natural phenols: Highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *BioFactors*, 40, 482–493.

ÍNDICES

ÍNDICE DE PALABRAS CLAVE

A

aceite de oliva, 129
aclimatación, 13
ADCC, 125
Asparagus officinalis, 81

B

biogas, 21
biología del suelo, 29
biomasa vegetal total, 43
Botrytis cinerea, 47

C

capacidad antioxidante, 113
capota de almendra, 55
celiaquía, 9
célula madre tumoral, 109
células-iniciadoras de tumores, 59
CITs, 71
composición química, 55
compuestos fenólicos, 113
contaminación, 77
correlate of protection, 125
CRC, 71

D

decaimiento lento, 81
dieta, 105
DTPA-TEA, 101

E

efectores, 33
endurecimiento, 13
enmienda, 77
ensilados, 51
Escherichia coli, 121
espectrofotometría UV-Visible, 93
espectroscopía, 101
espermatozoide, 17
estudio inmunogénico, 117
eyaculado, 17

F

Factor Derivado del Epitelio Pigmentario, 109
fermentación ruminal in vitro, 55
Folin-Ciocalteu, 129
fósforo, 43, 93
fusariosis, 81
Fusarium oxysporum f.sp. lactucae, 85

G

gender, 21
glifosato, 29
glioblastoma, 37

glioblastoma multiforme, 109
gluten, 9
granja virtual (eFarm), 105
grapevine, 47

I

inhibidores de la nitrificación, 97
inmunoterapia, 59
invasión, 89

L

longitud de hifas extrarradicales, 43

M

marcadores específicos, 85
melanoma, 59
metales pesados, 77
miraculina, 117, 121
mycoviruses, 47

O

oligoelementos, 97, 101
óxido nítrico, 97
ozono, 25

P

pan, 9
PEDF, 37, 71
pH, 51
Pinus radiata, 13
poda Guyot, 67
poda Royat, 67
polifenoles, 129
producción de leche, 105
proteína modificadora del sabor, 121

Q

R

refrigeración evaporativa, 63
roller crimper, 29

S

silage, 89
simbiosis rizobio-leguminosa, 33
suelos agrícolas, 93
Synsepalum dulcificum, 113, 117

T

T6SS, 33
temozolomida, 37
terneros mamonos, 63

tolerancia, 25
Triticum aestivum L., 25
Typha, 21, 51
Typha grass, 89

U

universal influenza vaccine, 125

V

valoración, 17
variedades diferenciales, 85
ventilación, 63
Vitis vinifera, 67

ÍNDICE AUTORES

Alegría, Nicolás	105, 109
Alfonso, Elizabeth	67
Astorgano, David	105
Barroso Matrán, Laura	101
Beltrán Urías, Daniela	89
Brizuela, Alexandri	77, 81
Carrero-Victorino, Francisco Javier	63
Centurión Giménez, Nelly Soledad	29, 39
De Aramburu- Lamas, María	113, 117, 125
de Evan, Trinidad	47, 51
De Sousa, Bruna Fernanda	33
Díaz de Vivar, Almudena	97
Escalera Merino, Alba	121
Esteban-Barroso, Alex	125
Fañanás, Iris	13
Fernández, Álvaro	73
Fernández-Zarate, Franklin Hitler	93
Ferré, Teresa	97
Gómez-Bravo Puerta, Daniel	9
Gómez-Calle, María Fernanda	93
González- Martos, Raquel	113, 117, 125
González-Pulido, María Fernanda	55
Gutiérrez, Lucía	17
Hernández Velayos, Daniel	59
Isaza-Gómez, Juan Sebastián	93
Jiménez Montenegro, Lucía	25
Lacalle-Olarte, Sara	63
Lázaro-Hernández, Lucía	63
López Gómez, Rocío	101
Luján Tirado, María	37
Menéndez, Adrián	105, 109, 113, 117
Mero Vera, Cynthia Patricia	77
Noguera, Adolfo Guillermo	81
Quiroz, Josefa	105, 109
Quiroz-Troncoso, Josefa	113, 125
Rodríguez Castañeda, Arlet Ariadne	89
Ruiz Padilla, Ana	43
Sánchez, María	17
Sevillano, Fernando	17
Staff, Ana	85
Tang, Yi	63
Tighilt, Lilia	33
Tocto, Vladimir;	51
Tornel, Rossana	21
Ulcuango, Kelly	29, 39
Usano, María Cruz	81
Villacrés, Raquel	47

ÍNDICE TUTORES

Alegría Aravena, Nicolás	37
Almendros, Patricia	97
Aydillo Gómez, Teresa	121
Ayllón Talavera, María Angeles	43
Baeza, Pilar	63
Bañuelos Bernabé, María Antonia	9
Benavente Barzana, Elena	25
Bensadon, Loan	109, 113
Cañal Villanueva, María Jesús	13
Carro Travieso, María Dolores	47,51
García Marco, Sonia	89, 93, 97
García Sastre, Adolfo	121
Garrido Arandia, María	9
Giménez Caminero, María Estela	25
González Rodríguez, Demetrio	89, 93
González-Martos, Raquel	117
Hontoria, Chiquinquirá	29, 39
Iglesias, Eva	21, 85
Lamelas Penas, Laura	13
Mariscal-Sancho, Ignacio	29, 39, 73
Masaguer, Alberto	73
Mattioli, Simona	17
Ovejero Rubio, Ismael	59
Palmero Llamas, Daniel	77, 81
Ramírez-Castillejo, María Del Carmen	37, 55, 67, 105, 109, 113, 117, 125
Rebollar, Pilar.G.	17
Rey Navarro, Luis	33
Villamide Díaz, María Jesús	101



$J \cos 2x - \sin 3x \ln x$



PATROCINADO POR:

