

Sumario

Producción Vegetal

- Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad
Molecular mechanisms in plant salt tolerance
L. Chávez, L.M. González 231
- Sales y nitrato exportados el drenaje de los regadíos de Bardenas
Salts and nitrates exported in the Bardenas drainage
J. Causapé 257
- Identificación del inicio de la ecodormancia en cerezo variedad "Bing"
Identification of the beginning of the ecodormancy in "Bing" sweet cherry variety
E. Tersoglio, G. Naranjo 272
- Prolina en tejidos y exudados de raíz como respuesta al estrés salino de cultivos de raíces aisladas de patrones frutales del género Prunus
Proline content in root tissues and root exudates as a response to salt stress of excised root cultures of Prunus fruit tree rootstocks
J.A. Marín, P. Andreu, A. Carrasco, A. Arbeloa 282

Producción Animal

- Efecto de la duración de la fase de volteo de los huevos de perdiz roja (*Alectoris rufa*) durante la incubación sobre la tasa de eclosión
Effect on hatchability of length of time for turning eggs during the incubation in Red-legged partridge (Alectoris rufa)
P. González-Redondo, S. De la Rosa Sánchez 291
- Aspectos epidemiológicos de la neosporosis bovina en el Nordeste español. Una perspectiva clínica
Epidemiological aspects of bovine neosporosis in north east Spain. A clinical perspective
S. Almería de la Merced, F. López-Gatius 296
- Efecto de la estimulación eléctrica de la canal sobre la calidad de la carne de vacunos de pastoreo
Effect of carcass electrical stimulation on meat quality of grazing cattle
J. Franco, G. Bianchi, O. Feed, G. Garibotto, F. Ballesteros, O. Bentancur, M. Carrere, J. Chiruchi 313

Relación de artículos publicados en ITEA durante 2009

ITEA 105 (1)

Producción Animal

- Descripción del crecimiento de tres tipos genéticos de gallinas españolas y una línea comercial sasso. Efecto del tipo de alojamiento
Growth modelling in three Spanish chicken genetics types and a COMMERCIAL line SASSO. Effect of the type of housing
J.A. Miguel, B. Asenjo, J. Ciria y J.L. Calvo 7
- Factores de Riesgo de la Retención de Placenta en la Vaca: Estudio retrospectivo en el Noroeste de España
Risk factors for retained placenta in the cow: A retrospective study in the North West of Spain
J.J. Becerra, L.A. Quintela, C. Díaz, P.G. Herradón 17
- Efecto del peso de la canal sobre la calidad de la carne de "Chivo Lechal Malagueño"
"Chivo Lechal Malagueño" meat quality as affected by carcass weight
M. Juárez, J.M. Micheo, E. García, F. Peña, O. Polvillo 28

Producción Vegetal

- Rentabilidad económica del regadío de los canales de Urgell (Lleida, España)
Economic profitability in the Urgell Canals (Lleida, Spain) irrigation area
M.M. Clop, Ll. Cots, M. Esteban, J.D. Barragán 36
- Estrategias comerciales para el vino ecológico de Castilla-La Mancha
Some commercial strategies carried out for Castilla-La Mancha Organic Wines
R. Bernabéu, M. Díaz, R. Olivas 49
- Evaluación de parámetros de calidad del azafrán del Jiloca (Teruel)
Evaluation of quality parameters in the saffron from Jiloca (Teruel)
J.M. Álvarez, C. Mallor 61
- Situación del material vegetal de melocotonero utilizado en España
Plant material of peach, situation in Spain
G. Llácer, J. M. Alonso, M.J. Rubio, I. Batlle, I. Iglesias, F.J. Vargas, J. García-Brunton, M.L. Badenes 67

ITEA 105 (2)

Producción Vegetal

- Elaboración de nuevos sustratos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. basados en sustratos degradados por el cultivo de hongos
Elaboration of new substrates for cultivating Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm. based on degraded substrates from edible fungi cultivation
A. Pardo-Giménez, J.E. Pardo-González 89

- Retos y perspectivas de los nuevos cultivares y patrones de almendro para un cultivo sostenible
Challenges and perspectives of new almond cultivars and rootstocks for a sustainable production
 R. Socías i Company, J. Gómez Aparisi, J.M. Alonso, M.J. Rubio-Cabetas y O. Kodad 99

Producción Animal

- Evaluación de la sostenibilidad en explotaciones de dehesa en función de su tamaño y orientación ganadera
Assessment of the sustainability in dehesa farms according to size and livestock prevalence
 P. Gaspar García, F. J. Mesías Díaz, M. Escribano Sánchez y F. Pulido García 117

ITEA 105 (3)

Producción Animal

- Evaluación de la eficacia del programa de monitorización de las poblaciones de vectores de lengua azul,
Culicoides imicola Kieffer, 1913 y complejo *Culicoides obsoletus* Meigen, 1818 (Diptera: Ceratopogonidae),
 en España
Evaluation of the monitoring programme of populations of the bluetongue vectors Culicoides imicola
Kieffer, 1913 and Culicoides obsoletus complex Meigen, 1818 (Diptera: Ceratopogonidae) in Spain
 C. Calvete, R. Estrada, M.A. Miranda, R. Del Rio, D. Borrás, L. Garrido, B. Muñoz, L.J. Romero, J. Lucientes 147

- Efectos del nivel de proteína de la dieta, sobre la condición corporal y la calidad reproductiva de
 reproductores pesados, criados en condiciones tropicales
Effects of the protein level of the diet, in corporal condition and reproductive capacity in heavy broilers
breeder males, in tropical conditions
 J.A. Miguel, E. Acevedo, J. Ciria, B. Asenjo y J.L. Calvo 161

- Una visión sobre la avicultura para la producción de caza en España
A view of the game bird farming in Spain
 C. Sánchez García-Abad, M.E. Alonso de La Varga, R. Prieto Martín, V. González Eguren
 y V.R. Gaudioso Lacasa 169

Producción Vegetal

- Conservación y eficiencia productiva: impacto de los programas agro-ambientales en la eficiencia de las
 explotaciones cerealistas de secano
Impact of agri-environmental scheme participation on dry-land cereal farms' efficiency
 J. Barreiro-Hurlé, J.M. Martínez-Paz, M. Espinosa-Goded 184

- Aprovechamiento del agua en los regadíos de Bardenas
Water use in the Bardenas irrigation district
 J. Causapé 202

ITEA 105 (4)

Producción Vegetal

- Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad
Molecular mechanisms in plant salt tolerance
 L. Chávez, L.M. González 231

- Sales y nitrato exportados el drenaje de los regadíos de Bardenas
Salts and nitrates exported in the Bardenas drainage
 J. Causapé 257

- Identificación del inicio de la ecodormancia en cerezo variedad "Bing"
Identification of the beginning of the ecodormancy in "Bing" sweet cherry variety
 E. Tersoglio, G. Naranjo 272

- Prolina en tejidos y exudados de raíz como respuesta al estrés salino de cultivos de raíces aisladas de patrones frutales del género *Prunus*
Proline content in root tissues and root exudates as a response to salt stress of excised root cultures of Prunus fruit tree rootstocks
J.A. Marín, P. Andreu, A. Carrasco, A. Arbeloa 282
- Producción Animal**
- Efecto de la duración de la fase de volteo de los huevos de perdiz roja (*Alectoris rufa*) durante la incubación sobre la tasa de eclosión
Effect on hatchability of length of time for turning eggs during the incubation in Red-legged partridge (Alectoris rufa)
P. González-Redondo, S. De la Rosa Sánchez 291
- Aspectos epidemiológicos de la neosporosis bovina en el Nordeste español. Una perspectiva clínica
Epydemiological aspects of bovine neosporosis in north east Spain. A clinical perspective
S. Almería de la Merced, F. López-Gatius 296
- Efecto de la estimulación eléctrica de la canal sobre la calidad de la carne de vacunos de pastoreo
Effect of carcass electrical stimulation on meat quality of grazing cattle
J. Franco, G. Bianchi, O. Feed, G. Garibotto, F. Ballesteros, O. Bentancur, M. Carrere, J. Chiruchi 313

Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad

L. Chávez, L.M. González

Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Carretera Vía Manzanillo Km 17. Bayamo. Granma. Cuba. E-mail: lchavez@dimitrov.cu

Resumen

La salinidad es uno de los factores abióticos más importantes por sus impactos negativos en las cosechas a nivel mundial, reduciendo el rendimiento de los principales cultivos de importancia económica en más de un 50 por ciento. Se describen los mecanismos moleculares fundamentales que utilizan las plantas para su adaptación a condiciones salinas estresantes, entre ellos se encuentran el mantenimiento de la homeostasis iónica, la síntesis de compuestos osmoprotectores, la reducción del daño por estrés oxidativo y el papel del ácido abscísico.

Palabras clave: Estrés salino, Plantas transgénicas, ABA, Homeostasis iónica.

Summary

Molecular mechanisms in plant salt tolerance

Salinity is one of the most important abiotic factors for its negative impacts on yield crops around the world with a reduction higher than 50 percent in many crops of economic importance. The fundamental molecular mechanism for the plant adaptation to saline conditions as the maintenance of the ionic homeostasis, the synthesis of osmotic protector compounds, the reduction of damage for oxidative stress and the abscisic acid role are described in plant salt tolerance.

Key words: Saline stress, Transgenic plants, ABA, Ionic homeostasis.

Introducción

El desarrollo de plantas tolerantes a la salinidad es una necesidad para mantener y elevar la producción agrícola (Munns *et al.*, 2006). Los programas de mejoramiento convencional para obtener plantas que toleren el estrés salino han obtenido un éxito muy limitado debido a la complejidad del carácter. El lento progreso en los programas de mejora puede atribuirse al pobre conocimiento o entendimiento de los mecanismos moleculares de tolerancia a la salinidad. Además, comprender las bases moleculares de la tolerancia de las plantas a la salinidad

también ayudará a mejorar la tolerancia a la sequía y a las temperaturas extremas, porque el estrés osmótico es común a estos estreses abióticos (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Las plantas responden al estrés salino a tres niveles diferentes: celular, tisular y de planta completa (Munns y Tester, 2008). Es por ello que para entender satisfactoriamente la tolerancia de las plantas a la salinidad, los mecanismos a cada nivel deben estudiarse individualmente (Larcher, 2003).

El objetivo de este trabajo es describir algunos de los mecanismos moleculares fundamentales que utilizan las plantas para su adaptación

a condiciones salinas estresantes, entre ellos, el mantenimiento de la homeostasis iónica, la síntesis de compuestos osmoprotectores, la reducción del daño por estrés oxidativo y el papel del ácido abscísico.

ciclo celular reduciendo la expresión y actividad de ciclinas y proteínas quinasa dependientes de ciclinas, lo que trae como resultado menos células en los meristemos, y un crecimiento limitado.

La salinidad y sus efectos nocivos sobre los cultivos

El estrés salino afecta al desarrollo de la planta, incluyendo la germinación, el crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo. También limita indirectamente la productividad de las plantas a través de sus efectos adversos en microorganismos simbióticos beneficiosos.

La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos porque reduce el potencial hídrico de la solución del suelo, por lo que disminuye la disponibilidad de agua, y crea un desequilibrio nutritivo, dada la elevada concentración de elementos (Na^+ , Cl^-) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular (Amini *et al.*, 2007). En consecuencia, los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento, hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado del estrés hídrico, la toxicidad iónica y el desequilibrio nutricional (Parida y Das, 2005; Vijayan, 2008).

La salinidad afecta la fotosíntesis (Chaves, 2009), principalmente a través de la reducción del área foliar, el contenido de clorofila y la conductancia estomática, y en menor extensión a través de una disminución de la eficiencia del fotosistema II (Chinnusamy *et al.*, 2005). Los efectos adversos de la salinidad pueden atribuirse al efecto del estrés salino sobre el ciclo celular y la diferenciación. La salinidad detiene temporalmente el

Tolerancia de las plantas a la salinidad

De acuerdo con la tolerancia a las condiciones de salinidad en el suelo, las plantas pueden ser clasificadas en aquellas que requieren o toleran altas concentraciones de sales, o halófitas, y las que no toleran la presencia excesiva de sales, o glicófitas. Existen categorías intermedias entre ambos grupos –pseudohalófitas–, así como plantas que, sin ser halófitas, requieren sodio como elemento esencial. La sensibilidad de las plantas a las sales varía durante el desarrollo fenológico, dependiendo de la especie, el cultivar y factores ambientales (Munns, 2002).

Se ha planteado que en la evolución de los mecanismos de tolerancia y adaptación de las plantas al estrés salino así como a diferentes factores abióticos estresantes, puede observarse la existencia de grados de susceptibilidad y de tolerancia muy diferentes, tanto desde el punto de vista de los mecanismos, como de la amplitud y distribución entre las diversas especies, e incluso variedades y ecotipos dentro de una misma especie. Esto evidencia la diversidad de estrategias que han desarrollado las plantas, para mantener una respuesta altamente refinada ante la amplia gama de estrés a que son expuestas las mismas (González, 2002).

La mayoría de las especies comestibles de granos y vegetales son glicófitas muy susceptibles a la salinidad del suelo, aún cuando la conductividad eléctrica sea menor de 4dS/m. Especies tales como: frijoles (*Phaseolus vulgaris*), berenjena (*Solanum melongena*), maíz (*Zea mays*), papa (*Solanum tuberosum*), y

caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), son muy susceptibles; mientras que la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y la cebada (*Hordeum vulgare*), pueden tolerar una CE de más de 7 dS/m. La remolacha y la cebada, sin embargo, son muy sensibles durante la fase de germinación, en cambio son muy tolerantes durante las fases posteriores de desarrollo (Chinnusamy *et al.*, 2005).

La respuesta adaptativa, para lograr tolerar la salinidad, debe interconectar tres aspectos en la actividad de la planta. El primero es prevenir o reparar el daño o la detoxificación. El segundo es el control de la homeostasis, incluye la homeostasis iónica y la osmótica que deben ser re-establecidas frente a las nuevas condiciones de estrés. En tercer lugar, el control del crecimiento, debe reanudarse pero con una tasa reducida (Zhu, 2001).

Para que una planta se adapte a las condiciones salinas, se deben activar múltiples mecanismos: debe aumentarse la capacidad de obtener y/o retener agua, y debe restituirse la homeostasis iónica (Bargmann *et al.*, 2009). Estos mecanismos de adaptación se reflejan macroscópicamente como un menor crecimiento, modificación de la relación parte aérea/raíz, limitación de la expansión foliar, y son consecuencia de cambios bioquímicos (incremento de la síntesis de ácido abscísico y solutos osmoprotectores) y fisiológicos (alteración de la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, cierre estomático, disminución de transpiración y fotosíntesis, etc). Esta respuesta adaptativa está gobernada por señales moleculares que regulan la relación con el medio externo (por ejemplo, cambios en la actividad de canales y transportadores de membranas) y por la activación y transcripción de genes entre cuyos efectos está la modificación de rutas biosintéticas que resultan en ajuste osmótico y la protección de las estructuras celulares (Zhou *et al.*, 2007).

El interés por mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad ha ido creciendo en los últimos años, empleando métodos de mejora y selección tradicionales o la producción de organismos modificados genéticamente (Cuartero *et al.*, 2006). La incorporación de genes procedentes de parentales silvestres tolerantes, la domesticación de plantas halófilas silvestres, y la identificación de caracteres relacionados con tolerancia empleando marcadores moleculares (Owuso, 2008), o bien la incorporación de genes cuya expresión modifica mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la tolerancia (Sairam y Tyagi, 2004).

A continuación nos referiremos a algunos mecanismos moleculares que son utilizados por las plantas para su tolerancia al estrés salino.

Mecanismos moleculares implicados en la tolerancia de las plantas a la salinidad

Mantenimiento de la homeostasis iónica

Como hemos expresado con anterioridad el establecimiento de la homeostasis iónica es un requerimiento esencial para que las plantas sobrevivan en condiciones de estrés salino (Bargmann *et al.*, 2009). La regulación del flujo iónico es necesaria para que las células mantengan adecuada concentración de iones esenciales y baja la concentración de iones tóxicos (Senadheera, 2009). Bajo estrés salino, el mantenimiento de la homeostasis de K⁺ y Na⁺ es de vital importancia en células vegetales. Estas necesitan mantener altas las concentraciones de K⁺, entre 100 y 200 mM, para realizar de forma adecuada las reacciones metabólicas (Rodríguez-Pérez, 2006); por lo que se puede plantear que la tolerancia a la salinidad requiere no solo la adaptación a la toxicidad provocada por el Na⁺, sino también, a la adquisición de K⁺, cuya toma por la

planta se afecta debido a la semejanza química entre ambos iones (Wang *et al.*, 2007). De ahí que las membranas y sus componentes necesarios para la toma y distribución de iones y solutos, se consideran determinantes en el desarrollo de plantas tolerantes a la salinidad (Senthilkulmar *et al.*, 2005). Los transportadores, canales, simportes y antiportes, son los principales involucrados en el fenómeno de transporte a nivel de planta. Por otro lado los niveles de sodio, deben ser menores que 1mM en el citoplasma, cualquier exceso tiene que ser excluido fuera de la célula o almacenado dentro de la vacuola (Vera-Estrella *et al.*, 2005).

Daños causados por el exceso de Na⁺:

1. Interrupción del equilibrio iónico: el influjo de Na⁺ disipa el potencial de membrana y facilitan la toma de Cl⁻ en contra del gradiente químico.
2. El Na⁺ es tóxico al metabolismo celular y tiene efecto deletéreo en el funcionamiento de algunas enzimas.
3. Altas concentraciones de Na⁺ causan desbalance osmótico, desorganización de la membrana, reducción en el crecimiento, inhibición de la división y expansión celular.
4. Altos niveles de Na⁺ también conducen a la reducción en la fotosíntesis y al incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (Mahajan y Tuteja, 2005).

Mientras que, como hemos visto, el exceso de Na⁺ en las células, conduce a respuestas fisiológicas que afectan los procesos de división y crecimiento a nivel celular (Tester y Davenport, 2003; Zhu, 2003; Shi *et al.*, 2003), el potasio, es uno de los elementos minerales esenciales en las células vegetales.

Las funciones del K⁺ en la célula vegetal son:

1. Mantener el balance osmótico.
2. Participar en los procesos de apertura y cierre estomático.

3. Ser cofactor esencial para muchas enzimas tales como la piruvato quinasa.
4. Mantener la turgencia celular.
5. Unir los ARNt a los ribosomas, de ahí su importancia en la síntesis de proteínas (Chinnusamy *et al.*, 2005).

El mantenimiento de altas concentraciones de K⁺ y bajas concentraciones de Na⁺ en el citosol se logra a través de una regulación coordinada de los transportadores para H⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Na⁺. Las H⁺-ATPasas de la membrana plasmática, sirven como bombas primarias, que generan un gradiente protónico, que facilita el transporte de otros solutos, incluyendo el Na⁺ y K⁺ (Zhao *et al.*, 2008). Este sistema es un componente de la respuesta de la planta a la salinidad. Las células vegetales emplean, además del transporte activo primario, mediado por H⁺-ATPasas, el transporte activo secundario, mediado por canales y cotransportadores, para mantener en el citosol concentraciones altas de K⁺ y bajas de Na⁺ (Bartels y Ramanjulu, 2005).

Existe una mayor comprensión sobre los sistemas de transporte y mecanismos regulatorios que median la relación Na⁺/K⁺ en células vegetales; éstos corresponden a los sistemas de transporte de alta y baja afinidad ubicados en el plasmalema y en el tonoplasto (Demidchik *et al.*, 2002; Zhu, 2002; Zhu, 2003). Las proteínas integrales de membrana actúan como transportadoras, sufriendo un cambio conformacional durante el transporte del ión y operando en contra de gradientes de concentración energizados por gradientes electroquímicos (antiporte Na⁺/H⁺, simporte K⁺/H⁺, simporte K⁺/Na⁺) (Berthomieu *et al.*, 2003; Sul *et al.*, 2003). Un tipo de transportador de los iones Na⁺ y K⁺ bien reconocido es el perteneciente a la familia de los HKT, identificado y evaluado en *Arabidopsis* (Rus *et al.*, 2004), arroz (Fukuda *et al.*, 2004) y trigo (Laurie *et al.*,

2002), entre otros. El HKT, transportador de alta afinidad para K^+ y descrito en *Arabidopsis*, funciona acoplado al Na^+ y contribuye al suministro de este ión en suelos salinos. Bajo concentraciones altas de Na^+ , el HKT puede tener más importancia fisiológica en el transporte de Na^+ que en el de K^+ (Rus *et al.*, 2004).

En arroz (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) se demostró que el suministro de Na^+ y K^+ está mediado por diferentes transportadores y que el K^+ se bloquea por el transportador de Na^+ . La expresión del OsHKT1 y el HKT4 demuestra que éstos son transportadores de alta y baja afinidad para Na^+ . Los transportadores OsHKT están involucrados en el transporte de Na^+ en arroz, y el OsHKT1 media específicamente el suministro de Na^+ en las raíces cuando estas plantas son deficientes en K^+ (Fukuda, 2004).

Existen transportadores muy selectivos para el K^+ , con una elevada afinidad por este ion (10-50 mM), pero que también pueden transportar Na^+ con baja afinidad y ser bloqueados por altas concentraciones de Na^+ en el medio (Rodríguez-Navarro, 2000). Entre estos transportadores están los de tipo KUP-HAK de cebada y *Arabidopsis*. Por el contrario, Los transportadores de HKT manifiestan una alta afinidad por Na^+ y en sistemas heterólogos se comportan como simportes Na^+/K^+ o uniportes de Na^+ (Horie *et al.*, 2001). Su función fisiológica es incierta pero la evidencia genética indica que la proteína HKT1 de *Arabidopsis* es una vía sustancial de entrada de Na^+ en la planta (Rus *et al.*, 2001). El transportador de baja afinidad, LCT1, también es permeable al Na^+ , pero su contribución relativa a la captación de Na^+ es desconocida.

Los canales iónicos constituyen otro sistema de transporte que permite la disipación rápida de un gradiente iónico establecido a

través del plasmalema. Se conocen tres tipos de canales que pueden mediar en la entrada o salida de iones como K^+ y Na^+ a través del plasmalema (Rodríguez-Navarro, 2000), denominados canales rectificadores de entrada de K^+ (KIRC), canales rectificadores de salida de K^+ (KORC), y canales independientes del voltaje (VIC) (Rubio *et al.*, 2004). La selectividad K^+/Na^+ de estos canales iónicos varía ampliamente (Demidchik, 2007). Los canales KIRC y KORC son altamente selectivos para K^+ en condiciones fisiológicas de crecimiento. Sin embargo, los canales de tipo KIRC pueden permitir una entrada significativa de Na^+ a largo plazo en un medio salino, debido a que en esas condiciones presentan una conductividad iónica máxima y el gradiente electroquímico de Na^+ es elevado (Amtmann y Sanders, 1999). Por el contrario, aunque los canales de tipo VIC representan una pequeña fracción de la conductividad total de la membrana, no discriminan entre Na^+ y K^+ . Considerando en su conjunto la abundancia y características funcionales de los distintos canales iónicos, se ha estimado que los VIC constituyen la vía principal de entrada de Na^+ en las células vegetales (Amtmann y Sanders, 1999). La actividad de los VIC parece modulada por nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP), por lo que podrían ser equivalentes a los canales de tipo CNCG (cyclic nucleotide-gated channels) caracterizados originalmente en células animales y que también están presentes en las células vegetales (Donalson *et al.*, 2004).

Si se produce una entrada importante de Na^+ en el citosol, la relación K^+/Na^+ fisiológica debe ser restablecida para evitar el efecto tóxico del Na^+ (Anil *et al.*, 2007). Esto se consigue en algunas especies con un sistema de transporte localizado en la membrana vacuolar (tonoplasto), que permite acumular Na^+ en la vacuola de manera activa, en contra del gradiente electroquímico del

Na⁺. Este sistema consiste en un antiportador Na⁺/H⁺ (denominado NHX) que acopla la entrada de Na⁺ a la salida de H⁺. La presencia de una actividad antiportadora Na⁺/H⁺ se detectó primero en tonoplasto de especies tolerantes a salinidad como remolacha y cebada, donde se inducía por la presencia de NaCl en el medio (Barkla y Pantoja, 1996). No obstante, la evidencia molecular disponible indica que estas proteínas son ubicuas en las plantas. En el genoma de *Arabidopsis thaliana*, completamente secuenciado, se reconocen hasta 6 isoformas diferentes de genes *NHX* (Maser *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2002). La compartimentación del Na⁺ en la vacuola, al tiempo que libera al citosol del exceso de Na⁺, contribuye a disminuir el potencial osmótico y ajustar el potencial hídrico celular para permitir la absorción de agua durante el estrés salino. Además, la proteína NHX1 de *Arabidopsis* tiene la capacidad de transportar tanto Na⁺ como K⁺, pudiendo contribuir al balance osmótico celular y tisular en cualquier condición de crecimiento de la planta (Leidi y Pardo, 2002).

Verma y colaboradores (2007) clonaron una nueva isoforma del antiporte vacuolar Na⁺/H⁺ en *Pennisetum glaucum* (PgNHX1), la cual contiene cinco dominios transmembrana en contraste con la isoforma de *Arabidopsis* AtNHX1 que contiene nueve dominios transmembranales. La sobreexpresión de PgNHX1 en arroz también confiere tolerancia a la salinidad debido a que las plantas transgénicas desarrollan un sistema radical más extenso y completan su ciclo de vida en presencia de 150 mM de NaCl.

Otro sistema importante para conseguir la reducción del Na⁺ citosólico es la expulsión al medio extracelular, proceso también conocido como extrusión (Flowers y Colmer, 2008). La extrusión de Na⁺ se produce en hongos y algunas especies de algas marinas

por bombas (ATPasas) transportadoras de Na⁺ (Gimmler, 2000), mientras que en la mayoría de las algas y en plantas superiores está mediada por antiportadores Na⁺/H⁺ del plasmalema (Blumwald *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000). La actividad de antiportadores Na⁺/H⁺ en el plasmalema, que expulsan Na⁺ al exterior de la célula en un intercambio por H⁺, requiere un gasto energético ya que debe efectuarse en contra de un gradiente de potencial electroquímico. La inducción en tomate de una ATPasa transportadora de H⁺ de plasmalema por el estrés salino podría responder a la necesidad de generar el gradiente de protones requerido por el antiportador Na⁺/H⁺ (Kalampanayil y Wimmers, 2001).

Se ha sugerido que la extrusión de Na⁺ podría constituir a largo plazo un serio problema en las células de algunos tejidos, como las hojas, ya que la acumulación extracelular de Na⁺ podría ser aún más dañina que su inclusión al generar un déficit hídrico extremo (Yeo, 1998). Además de reducir el contenido celular de Na⁺, el antiportador Na⁺/H⁺ del plasmalema de *Arabidopsis*, *SOS1*, también media en el transporte de Na⁺ desde la raíz al mesófilo foliar y es esencial para la redistribución del Na⁺ entre los tejidos vegetales (Shi *et al.*, 2002). Un factor determinante del daño celular en arroz es la deshidratación producida por la acumulación de sales en el espacio extracelular (Flowers *et al.*, 1991) de la que podría no ser ajena la actividad de ese antiporte. Sin embargo, el balance neto de la actividad antiportadora Na⁺/H⁺ en el plasmalema deber ser positivo para la planta ya que los mutantes *sos1* de *Arabidopsis*, carentes de dicha actividad, son extremadamente sensibles a NaCl. Por razones todavía desconocidas, los mutantes sin *SOS1* o en los que su actividad está disminuida (mutantes *SOS2* y *SOS3*) son incapaces de tomar K⁺ a bajas concentraciones exteriores (Zhu, 2000).

Papel del calcio en la respuesta de la planta al estrés salino

El papel del ión Ca^{2+} en la respuesta de las plantas a salinidad resulta esencial, por su papel señalizador, su función estructural en la membrana y su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos (Klimecka y Muszynska, 2007). La presencia de Ca^{2+} puede reducir la magnitud del efecto negativo de la salinidad en el crecimiento, fenómeno que se ha atribuido al efecto estabilizador de la membrana y al mantenimiento de su capacidad selectiva (Marschner, 1995). El Ca^{2+} extracelular podía reducir la pérdida de K^+ inhibiendo los canales de salida KORC (Murata *et al.*, 2000), y disminuir la entrada de Na^+ mediante la inhibición de canales KIRC y sobre todo VIC (Maathuis y Amtmann, 1999). Por otra parte, el Ca^{2+} intracelular tendría un papel no menos esencial en la absorción de K^+ y la selectividad K^+/Na^+ en condiciones salinas mediante la modulación de otros transportadores iónicos como SOS1 (Zhu, 2000). La expresión del gen SOS1 es dependiente del complejo SOS2/SOS3, donde SOS2 es una proteína quinasa y SOS3 es una proteína sensora de Ca^{2+} (Hussain *et al.*, 2008). Se conoce que el papel del Ca^{2+} es complejo, ya que actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta adaptativa (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Proteínas LEA, HSP y poliaminas

Proteínas LEA

La salinidad, así como las altas temperaturas y la sequía, pueden causar la desnaturalización y la pérdida de sus funciones en numerosas proteínas. Las HSP (siglas en inglés: heat shock protein) y las proteínas LEA (siglas en inglés: late embryogenesis abun-

dance) ayudan a proteger las proteínas celulares contra el estrés, controlando el plegamiento y la conformación de las proteínas estructurales y enzimas (Wang *et al.*, 2004). Además se ha demostrado que las proteínas LEA y las chaperonas están involucradas en la protección de moléculas, tales como enzimas, lípidos y ARNm, de la deshidratación (Sairam y Tyagi, 2004).

Durante el desarrollo y la maduración, cuando tiene lugar una desecación natural, las semillas acumulan transcritos y proteínas en una concentración relativamente alta, por esta razón, donde primero se encontraron estas proteínas, fueron llamadas LEA (Kalemba y Pukacka, 2007). Las proteínas LEA son un grupo de proteínas inducibles por el ABA y originalmente se sugirió que pueden estar asociadas con la tolerancia a la desecación durante la maduración de la semilla y también inducidas por la salinidad y el déficit de agua (Vital Vas *et al.*, 2007). Las proteínas LEA se agrupan en al menos seis familias, en base a homología en su secuencia aminoacídica. El déficit de agua, la alta osmolaridad y bajas temperaturas, conllevan a la acumulación de un grupo de proteínas LEA. Actualmente se ha demostrado que estas proteínas pueden preservar la estructura proteica (Umezawa *et al.*, 2006) y la integridad de la membrana, preservando el agua, impidiendo la desnaturalización de proteínas y renaturalizando las proteínas ya desplegadas, además secuestrando iones en los tejidos estresados (Sairam y Tyagi, 2004).

Se han identificado varios grupos de proteínas LEA en cereales, de las cuales las pertenecientes al grupo 2, también llamadas deshidrinas son las proteínas solubles más eminentes, inducidas por el estrés osmótico (Roychoudhury y Basu, 2008).

El gen HVA1 que codifica para la proteína LEA es inducido por el ABA y varios tipos de

estrés, por ejemplo la salinidad. Plantas transgénicas de arroz que expresan el HV1, conducida por un promotor constitutivo del gen de la actina, mostraron un incremento significativo de la tolerancia a la salinidad (Xu *et al.*, 1996). Los mecanismos involucrados en la acción de este gen no están claros pero los autores proponen que el incremento de la tolerancia a la salinidad pudiera deberse a la estabilización de estructuras celulares.

Otros investigadores evaluaron la tercera generación de plantas transgénicas de avena (*Avena sativa* L.) que expresan el gen HVA1 de cebada, el gen de la β -glucuronidasa (*uidA*; *gus*) y el gen de resistencia a herbicidas *bar*. En comparación con las plantas control, las plantas transgénicas mostraron mayor crecimiento y un significativo incremento en la tolerancia a condiciones salinas estresantes (200 mM NaCl) para características como: altura de la planta, área foliar, longitud de la raíz, longitud de la panícula, número de espigas por panícula, número de tallos por planta, entre otras características. Plantas transgénicas de tabaco expresan el gen Rab16A, proveniente de la variedad india de arroz Pokkali, que codifica para una proteína LEA del grupo 2. La expresión del gen está controlada por un promotor inducible por la salinidad, lo que conlleva a una acumulación de la proteína en las hojas de las plantas transgénicas sometidas a este tipo de estrés. Las mismas mostraron un incremento significativo en la tolerancia a la salinidad y tasas de crecimiento sostenidas bajo condiciones estresantes. Adicionalmente mostraron un incremento en la producción de osmolitos tales como azúcares reducidos, prolina y poliaminas. También mostraron una mejor maquinaria antioxidante y un balance mineral más favorable, lo que se reflejó en los reducidos niveles de peróxido de hidrógeno y de peroxidación lipídica, menor pérdida de clorofila, así

como menor acumulación de sodio y mayor acumulación de potasio. Estos resultados establecen el posible papel del gen Rab16A en conferir tolerancia a la salinidad sin afectar el crecimiento y el rendimiento de las plantas transformadas. También sugieren el considerable potencial de los genes que codifican para el grupo 2 de proteínas LEA, para obtener plantas tolerantes a la salinidad a través de la ingeniería genética (Roy-Choudhury, 2007).

HSP

La familia de proteínas Dnak/Hsp70, chaperonas moleculares pueden unirse a otras proteínas en estado no nativo y ayudarlas a alcanzar su conformación funcional, en la mayoría de los casos con gasto de ATP (Boston *et al.*, 1996). Tabaco transgénico transformado con el gen Dnak1, que proviene de la cianobacteria halotolerante *Aphanotese halophytica*, que sobreexpresan estas proteínas en el citosol (Sugino *et al.*, 1999). Después de tres días de tratamiento con 0.6 M de NaCl, la tasa de fijación de CO₂ fue marcadamente mejor en las plantas transgénicas. El contenido de sodio en las plantas control se incrementó después del tratamiento salino, mientras que permaneció constante en las plantas transgénicas.

Se han descrito correlaciones positivas entre los niveles de varias HSP y la tolerancia al estrés (Wang *et al.*, 2004). Zhou y colaboradores (2007) encontraron la inducción de cinco genes homólogos, inducidos por el estrés salino en plántulas de tomate, con funciones de chaperona, entre los cuales se encontraban las HSP (U217418, U218323). Por otro lado se ha estudiado ampliamente el incremento en la expresión de HSP bajo condiciones de estrés abiótico, a través de la genómica funcional y la proteómica, en diferentes especies de plantas (Kore-eda *et al.*, 2004).

Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son moléculas nitrogenadas alifáticas presentes en todos los organismos vivos y ubicuas en el reino vegetal (Moschou *et al.*, 2008). En los últimos años se han recopilado numerosas evidencias respecto al rol que estos compuestos juegan en la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico, y respecto a su función como potenciales compuestos antioxidantes. La diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetraamina espermina son las tres principales poliaminas que se encuentran en los organismos vivos. A pH fisiológico se encuentran cargadas positivamente y esta propiedad les permite interactuar con macromoléculas que poseen carga negativa, como el ADN, el ARN, proteínas y fosfolípidos. De esta manera las PAs están implicadas en la regulación de las propiedades físicas y químicas de la membrana, la estructura de los ácidos nucleicos y la modulación de actividades enzimáticas, además de ser reconocidas como esenciales en los procesos de proliferación y diferenciación celular. En las plantas, la putrescina se forma mediante la descarboxilación de la arginina o de la ornitina, reacción catalizada por la arginina descarboxilasa (ADC) o por la ornitina descarboxilasa, respectivamente (Liu *et al.*, 2006).

La diamina putrescina y las poliaminas, espermidina y espermina están presentes probablemente en todas las plantas, mientras que la diamina cadaverina, aparece dentro de la familia *Leguminosae*. En condiciones de salinidad y sequía, las poliaminas y las actividades enzimáticas involucradas en su síntesis se incrementan sustancialmente. Su función en situaciones de estrés salino pudieran ser, estabilizar el ADN mitocondrial y cloroplástico, estimulación de la biosíntesis proteica y estabilización de biomembranas (Roy y Wu, 2000).

En los últimos años se ha utilizado la ingeniería genética para incrementar la biosíntesis de

varias poliaminas específicas, lo que ha posibilitado obtener plantas tolerantes al estrés salino. El aumento en la expresión de la enzima arginina descarboxilasa, induce un incremento significativo en los niveles de putrescina y pequeño incremento en los niveles de espermina y espermidina (Vinocourt, 2005).

Kasubaba y colaboradores (2004) trabajaron para sobreexpresar el ADNc de la enzima espermidina sintasa de *Curcubita ficifolia* en *Arabidopsis thaliana* y obtuvieron elevados niveles de espermidina y consecuentemente un incremento en la tolerancia a varios tipos de estreses.

La acumulación de putrescina durante el estrés ambiental se correlaciona con el incremento de la actividad de la enzima arginina descarboxilasa en avena. Estudios con zana-horia transgénica, que expresa la enzima ornitín descarboxilasa (ODC) mostraron que estas plantas fueron significativamente más tolerantes al estrés salino y a la sequía (Bonhert *et al.*, 1995).

Las poliaminas han ganado importancia en el escape de las plántulas de condiciones adversas. Lin y Kao (1995) señalaron un incremento en los niveles de espermidina en condiciones salinas, pero un bajo nivel de putrescina en el tallo y las raíces de plántulas de arroz. La acumulación de espermidina espermina con el incremento de la actividad de la enzima ADC en plántulas de arroz juega un papel específico en la tolerancia a la salinidad.

Plantas transgénicas de arroz con el ADNc de ADC, mostraron un incremento de la biomasa en condiciones de estrés salino, comparados con las plantas utilizadas como control. Plantas de maíz sometidas a estrés salino durante 8 días incrementan su contenido de putrescina y espermidina en sus raíces y hojas, siendo el incremento en las hojas mayor que el de las raíces (Caldevia *et al.*, 1999).

Síntesis de compuestos osmoprotectores

El ajuste osmótico mantiene el contenido celular de agua cuando se presenta una reducción en el potencial osmótico, como consecuencia de la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma y en la vacuola en situaciones de estrés por salinidad en el suelo (Serraj y Sinclair, 2002). Los solutos compatibles (osmolitos, citosolutos) son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol y otros metabolitos de bajo peso molecular (Chen y Murata, 2002; Pommerrenig *et al.*, 2007). Los solutos compatibles no interfieren con el metabolismo normal de las células; se acumulan en el citoplasma y en la vacuola en altas concentraciones bajo condiciones de estrés osmótico, tienen un papel primario en el mantenimiento de la disminución del potencial osmótico en el citosol y están involucrados en la estabilidad de proteínas y estructuras celulares (Zhu, 2003; Bartels y Ramanjalu, 2005). En general, son varios los efectos de los solutos compatibles en las plantas: los azúcares, por ejemplo, interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos para prevenir la fusión de la membrana (Chen y Murata, 2002); los aminoácidos, por su parte, pueden actuar como osmolitos en la regulación del transporte de iones y tienen efecto en la síntesis y la actividad enzimática (Ray, 2002).

En los siguientes epígrafes haremos referencia individual a varios compuestos osmoprotectores y cómo sus rutas metabólicas, tanto de síntesis como de degradación, han sido objeto de manipulación a través de la ingeniería genética para la obtención de plantas tolerantes al estrés salino.

Prolina

La prolina es un aminoácido que constituye el compuesto osmoprotector más común que se

acumula en las plantas en respuesta al estrés hídrico y a la salinidad (Chen *et al.*, 2007). Aunque la prolina puede sintetizarse a partir del glutamato o la ornitina, el glutamato es el principal precursor en la síntesis de la prolina, en células osmóticamente estresadas (Hur *et al.*, 2004). La ruta biosintética de la prolina incluye dos enzimas importantes: pirrolín carboxilato sintetasa (P5CS) y pirrolín carboxilato reductasa (Parvaiz y Satyawati, 2008). Los transcritos correspondientes a los ADN complementarios que codifican para estas enzimas, se acumulan en la célula como respuesta al tratamiento con NaCl. Ambos pasos catalíticos son claves para el desarrollo de estrategias para la aumentar la producción de prolina en determinadas plantas. Además, los intermediarios en la biosíntesis y el catabolismo de la prolina, tales como la glutamina y el pirrolín-5-carboxilato, pudieran incrementar la expresión de varios genes regulados osmóticamente en el arroz (Iyer y Caplan, 1998).

La acumulación de prolina se ha provocado en diferentes especies de plantas incrementando su síntesis o impidiendo su degradación, mediante la manipulación de las enzimas P5CS y prolina deshidrogenasa. La sobreexpresión en tabaco del gen P5CS provenientes de frijol mungo resultó en la acumulación de prolina 18 veces más que las plantas control, incrementando la producción de biomasa en condiciones de estrés salino (Kishor *et al.*, 1995)

La expresión del transgén de la enzima P5CS de frijol, bajo el control de un promotor inducible por el estrés, conduce a la sobreproducción inducida por estrés de la enzima P5CS y la acumulación de prolina en plantas transgénicas de arroz. La segunda generación de plantas transgénicas mostraron un incremento en la biomasa bajo estrés salino (Zhu *et al.*, 1998).

La transformación genética de plantas de *Arabidopsis* con la enzima prolina deshidrogenasa antisentido (Mani *et al.*, 2002) o

“knockout” de esta enzima (Nanjo *et al.*, 2003), conllevó al incremento de la acumulación de la prolina libre y a un mejor crecimiento bajo condiciones salinas. En trigo se observa que la actividad de la enzima glucanil kinasa (GK), y las concentraciones de prolina y glicín betaína se incrementan durante el estrés y tienen mayor actividad en los brotes que en las raíces (Nayyar, 2003). En plantas de maíz se observa un incremento considerable en la acumulación de prolina; igualmente, se presenta un incremento en la actividad de la enzima prolina deshidrogenasa (PDH), tanto en maíz como en trigo.

Glicín-betaína

La glicín betaína se sintetiza a partir de la colina en dos pasos, el primero es catalizado por la enzima colina monooxigenasa conduciendo a la síntesis de aldehído de betaína, el cual es posteriormente oxidado por la enzima betaín aldehído deshidrogenasa. El estrés por salinidad induce ambas actividades enzimáticas (Sairam y Tyagi, 2004). Se ha demostrado que la acumulación de glicín-betaína en células de un número de halófitas y bacterias es una respuesta adaptativa a la salinidad. La oxidación de la colina a aldehído de betaína es la ruta biosintética predominante en los organismos productores de betaína (Rhodes y Hanson, 1993). El primer paso difiere entre varios organismos acorde al tipo de enzima. Este paso es catalizado por una flavoproteína-oxidasa (COXEC1.1.3.17) en algunas bacterias y hongos, por una monooxigenasa soluble dependiente de ferredoxina (CMO) en los cloroplastos de plantas superiores, o por una colina deshidrogenasa asociada a membrana pobremente caracterizada (CDHEC1.1.99.1) (Huang *et al.*, 2000).

Se ha informado por Lilius y colaboradores que plantas de tabaco transgénico con un

gen de *E. Coli* que codifica para la enzima colina deshidrogenasa, fueron más tolerantes a condiciones salinas que las plantas sin modificar, la tolerancia se midió como diferencia en el peso seco (Lilius *et al.*, 1996). Li y colaboradores (2003) clonaron el gen de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa proveniente de *Suaeda liaotungensis* y lo utilizaron para mejorar la tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas de tabaco.

Por otro lado se ha comprobado que existen evidencias genéticas de que la glicín betaína mejora la tolerancia a la salinidad en cebada y en maíz (Arakawa, 1990). Líneas isogénicas de cebada que contienen diferentes niveles de glicín betaína, muestran diferentes capacidades para el ajuste osmótico.

El gen *cod A*, aislado de la bacteria del suelo *Artrobacter globiformis*, codifica la colina oxigenasa. Esta enzima convierte la colina en glicín betaína. La transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el gen *codA*, posibilita que las plantas acumulen glicín betaína y se incrementa la tolerancia al estrés salino (Hayashi *et al.*, 1997). Las semillas de estas plantas transgénicas son capaces de germinar en 300 mM de NaCl, mientras las semillas de tipo silvestre no fueron capaces de germinar. Además las plantas transgénicas mantienen la actividad del fotosistema II bajo estrés salino.

Plantas transgénicas de arroz que expresan el gen *codA*, pero con la proteína codificada directamente en los cloroplastos, son más tolerantes que las plantas transgénicas que expresan la enzima en el citosol. Este resultado sugiere que la función protectora de la glicín betaína es más eficiente cuando es producida en el organelo fotosintético.

Otro paso en la síntesis de glicín betaína es catalizado por la enzima betaín deshidrogenasa (BADH). Plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *BADH* acumularon una mayor cantidad de glicín betaína en el

citósol y en los cloroplastos, exhibiendo un incremento en la tolerancia al estrés salino (Holmstrom *et al.*, 2000). También mostraron una disminución de la fotoinhibición durante el estrés salino lo que causó un incremento en el peso fresco relativo, en relación del fenotipo silvestre. Similares resultados de obtuvieron en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la enzima BADH de espinaca, en lugar de la BADH de un organismo procariota (Sakamoto *et al.*, 1998).

Los niveles de glicín betaína en especies de la familia *Poaceae* se correlacionan con la tolerancia a la salinidad. Los géneros altamente tolerantes *Spartina* y *Distichlis* acumulan los mayores niveles de glicín betaína, las especies moderadamente tolerantes acumularon niveles intermedios y las especies sensibles acumulan bajos niveles de glicín betaína o no la sintetizan (Sairam y Tyagi, 2004).

Alcoholes- azúcares

Manitol

El polialcohol manitol es una molécula que puede actuar como osmoprotector. Plantas de tabaco transgénico transformadas con el gen *mtID* de *E. Coli*, que codifica para la enzima manitol-1-P deshidrogenasa, acumularon manitol y mostraron un incremento en el crecimiento de las plantas sometidas a estrés salino, en comparación con las plantas control (Tarczynski *et al.*, 1993). Estudios posteriores revelaron que el incremento en el contenido de manitol no fue suficiente para explicar la tolerancia, basándose solamente en el ajuste osmótico por lo que se asignó a esta molécula una posible función antioxidante (Karakas *et al.*, 1997). Plantas de *Arabidopsis* transformadas con el mismo gen, fueron capaces de germinar en presencia de una concentración inhibitoria de sales. Sin embargo, a diferencia de las plantas de tabaco transformadas, las plantas de *Arabidopsis* no toleraron el estrés salino prolongado.

Otros investigadores obtuvieron tres líneas transgénicas de arroz con el mencionado gen *mtID* y demostraron que la biosíntesis y la acumulación de manitol en plantas se correlaciona con la tolerancia al estrés salino de las mismas (Su *et al.*, 1999). Plantas de trigo transgénico con este gen fueron más tolerantes al estrés por sequía y por salinidad (Abebe *et al.*, 2003). Las plantas transformadas mostraron un incremento en la biomasa altura de la planta y número de tallos secundarios. Sin embargo la cantidad de manitol acumulado fue muy pequeña para tener en cuenta su efecto como osmolito y se sugiere que pudiera actuar como desactivador de radicales libres, aunque también pudiera actuar como protectores y estabilizadores de enzimas, o estructuras de membranas que son sensibles a deshidratación o daños inducidos por el exceso de algunos iones (Parvaiz y Satyawati, 2008).

Sorbitol

Este azúcar alcohol de glucosa se encuentra en una variedad de especies, usualmente como constituyente de la semilla. La acumulación de sorbitol se ha reportado en muchas plantas de cultivo (Kuo *et al.*, 1990). En el género *Rosaceae*, su función es servir como carbohidrato de translocación. En la planta halotolerante *Plantago maritima* se ha encontrado en partes vegetativas (Pommering, 2007). En esta planta el incremento de la salinidad de 0 a 400 mol m⁻³ conlleva a un incremento de 8 veces la concentración de sorbitol en los tejidos del tallo y de 100 veces en los tejidos de la raíz. La acumulación de sorbitol en esta planta tiene función osmorreguladora y su acumulación en semillas sugiere que puede contribuir a la tolerancia a la desecación del embrión maduro.

Pinitol-ononitol

Los alcoholes cíclicos pinitol y ononitol se almacenan en una variedad de especies

expuestas a condiciones salinas, o acumuladas en especies tolerantes cuando se exponen a un ambiente salino. Plantas halófitas facultativas tales como *M. crystallinum*, acumulan estos compuestos solamente cuando se someten a estrés hídrico y salino. La ruta sintética propuesta consiste en la metilación del mioinositol para obtener el intermediario ononitol, seguido de la epimerización a pinitol (Sairam y Tyagi, 2004). Se aisló un ADN complementario que codifica para la enzima inositol-metil-transferasa, inducida en plantas de *Mesembryanthemum* por el NaCl (Vernon *et al.*, 1992). Se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que expresan esta enzima. El crecimiento de las plantas transformadas y sin transformar es similar en ausencia de estrés, pero en presencia de condiciones salinas las plantas transgénicas mostraron ventajas con respecto a las plantas control.

Trealosa

El metabolismo del carbono y los niveles de azúcares específicos se afectan severamente por el estrés abiótico. La trealosa es un disacárido no reductor presente en muchas bacterias y hongos, así como en muchas plantas superiores tolerantes al estrés hídrico. Las funciones que se sugieren para la trealosa son proteger las membranas y proteínas de las células expuestas al estrés hídrico y reducir la agregación de proteínas desnaturalizadas (Parvaiz y Satyawati, 2008).

Pequeños aumentos en los niveles de trealosa en plantas transgénicas conllevan a una mayor tasa fotosintética y a una disminución del daño fotooxidativo durante el estrés. Se supone que la trehalosa protege las biomoléculas del estrés salino y otros tipos de estrés ambientales, por su capacidad reversible de absorción de agua y evitar los daños producidos por la desecación (Pena, 2003).

Plantas que expresan enzimas relacionadas con la síntesis de la trealosa (ots A) mostraron un incremento en la tolerancia a la salinidad (Pilon-Smith *et al.*, 1998). El gen de levadura que codifica la enzima trehalosa-6-P-sintetasa introducido en tabaco y melón mejora la tolerancia al estrés salino, medida como el aumento del crecimiento de la planta. Sin embargo los autores observaron muchos efectos pleiotrópicos en estas plantas transgénicas, lo que sugiere que esta molécula está involucrada en otros procesos fisiológicos de la planta (Borsani, 2003).

Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo

La salinidad como causa del estrés oxidativo

Un efecto secundario de la salinidad es la formación de especies reactivas del oxígeno o radicales libres (Koprivova *et al.*, 2008). Durante la fase luminosa de la fotosíntesis se genera oxígeno molecular. Factores abióticos estresantes que inhiben las funciones del ciclo de Calvin (como la fijación de CO₂ y el consumo de NADPH₂) agravan la situación. El estrés salino induce el cierre de los estomas, limitando la disponibilidad de CO₂ en la célula (Sirichandra *et al.*, 2009) mientras que al mismo tiempo prosigue el transporte electrónico provocado por la luz. La absorción de luz por las hojas excede entonces la demanda de la fotosíntesis, y el exceso de energía de excitación conduce a una sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico. En términos moleculares, un desbalance en el consumo del NADPH₂, en la asimilación (durante la fijación del carbono) y la necesidad de la cadena de transporte electrónico de regenerar el aceptor electrónico en el fotosistema I (NADP), puede conducir a la transferencia del electrón a aceptores alternativos. La formación de

especies reactivas del oxígeno se inicia entonces por la reducción univalente del oxígeno, o por la transferencia del exceso de energía de excitación al oxígeno. La transferencia de electrones (uno, dos o tres) conduce a la generación del radical superóxido, peróxido de hidrógeno, o al radical hidroxilo, respectivamente (Mittler, 2002).

En resumen podemos plantear que la secuencia más probable de eventos que ocurren con el incremento de la salinidad es: déficit fisiológico de agua, cierre de los estomas regulados por el ABA, baja disponibilidad de CO₂, sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico y finalmente la generación de radicales libres. Esta condición llamada estrés fotooxidativo o estrés oxidativo, es también un término subrayado en la respuesta de las plantas a otros tipos de estrés como la sequía, temperaturas extremas y exceso de luz (Jithesh *et al.*, 2006).

Después del tratamiento estresante con NaCl ocurre el estrés oxidativo en muchas especies de plantas (del Río, 2006). Se ha señalado el papel importante del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno en los daños que sufre la planta sometida a estrés salino, en *Vigna unguiculata*, *Vigna catjang* y *Oryza sativa*. Otros estudios han establecido la relación entre el incremento de la capacidad antioxidante y la tolerancia a la salinidad en diferentes especies tales como chícharo, tomate y cítricos (Jithesh *et al.*, 2006). Todos estos estudios confirman que en plantas sometidas a estrés salino existe un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la actividad antioxidante, conduciendo a un daño por estrés oxidativo.

Mecanismos de defensa de las plantas frente al estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno en ausencia de mecanismos protectores pueden cau-

sar daños serios en diferentes estructuras y funciones celulares (Del Río, 2006). El radical hidroxilo es un radical libre altamente tóxico, capaz de iniciar la peroxidación lipídica y dañar el ADN, las proteínas y otras moléculas pequeñas (Liu *et al.*, 2008). Las plantas por tanto deben ser protegidas adecuadamente por un número de mecanismos antioxidantes para eliminar los radicales libres. Las vías de la planta para enfrentar el estrés oxidativo comprenden dos componentes, los enzimáticos y los no enzimáticos (Dastidar *et al.*, 2006).

Los componentes no enzimáticos son antioxidantes tales como el tocoferol (Liu *et al.*, 2008), carotenoides, ascorbato y glutatión, que son moléculas *scavengers* o desactivadores de radicales libres (Hung *et al.*, 2005). Los componentes enzimáticos comprenden enzimas tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, ascorbato peroxidasa (APX) (Gulen *et al.*, 2008), monohidroascorbato reductasa (MHAR) y glutatión reductasa (GR) (Stafandiari *et al.*, 2007).

Varios grupos de trabajo han desarrollado plantas transgénicas, que sobreexpresan genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, y en muchos casos se ha logrado corroborar la correspondencia entre la tolerancia a la salinidad y los niveles de compuestos antioxidantes (Kellós *et al.*, 2008). Tanaka y colaboradores examinaron el papel potencial de la enzima SOD en la protección contra el estrés salino. En presencia de altas concentraciones de sal, las plantas transgénicas tuvieron una elevada actividad APX, alrededor de 1.5 veces mayor que las plantas control. La actividad SOD total se mantuvo a niveles elevados. Se encontró que la actividad del fotosistema II y el transporte electrónico en los cloroplastos, fueron mayores en las plantas transgénicas bajo estrés salino comparados con las plantas nativas. Estos resultados sugieren que un incremento en los niveles de APX y SOD, son factores impor-

tantes para la tolerancia a la salinidad en arroz (Tanaka *et al.*, 1999).

Se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la enzima glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GRX). Las plantas transformadas mostraron las actividades específicas de GST y GPX dos veces mayor que las plantas sin transformar. No obstante el incremento en el pool de glutatión oxidado, las plántulas transgénicas exhiben un incremento de su tolerancia a la salinidad (Roxas *et al.*, 1997). Se había reportado previamente que la sobreexpresión de la enzima GR en plantas transgénicas conduce a elevados niveles de glutatión reducido, incrementando la tolerancia a la salinidad y al estrés oxidativo en hojas (Fayer *et al.*, 1991). Por tanto podemos plantear que la influencia del estado oxidativo del glutatión en la tolerancia al estrés salino en plantas aún no está determinada.

Una estrategia alternativa para eliminar el daño oxidativo bajo estrés salino podría ser suprimir la producción de especies reactivas del oxígeno. Aunque el papel de la fotorrespiración en condiciones de estrés es todavía muy controversial, pudiera funcionar como una posible ruta de disipación del exceso de energía luminosa (Osmond y Grace, 1995). Numerosos estudios sugieren que el paso limitante en la fotorrespiración es la reasimilación del amonio catalizada por la enzima glutamin-sintetasa cloroplástica GS2 (Wallsgrave *et al.*, 1987). Cuando las plantas de arroz se transformaron con la GS2 (Hashida *et al.*, 2000) acumularon 1.5 veces más GS2 que las plantas control. Estas plantas transgénicas tienen aumentada su capacidad para realizar la fotorrespiración y un incremento en la tolerancia al estrés salino.

El incremento en las actividades de las enzimas SOD, APX, CAT y GR en condiciones de salinidad y de otros tipos de estrés abiótico, y su comparativamente mayor actividad en

genotipos tolerantes de trigo se ha reportado por Sairam y colaboradores (Sairam *et al.*, 1997). El incremento de la actividad de SOD, APX, GR, DHAR, CAT y POX en respuesta al estrés salino, así como su mayor actividad antioxidante en especies y variedades tolerantes se ha reportado por varios investigadores, (Roxas *et al.*, 2000).

Sairam y Srisvastava 2002, reportaron comparativamente mayores actividades de las enzimas Cu/Zn SOD, Fe-SOD, APX y GR en la fracción cloroplástica y la actividad Mn-SOD en la fracción mitocondrial, en genotipos tolerantes de trigo, en respuesta al estrés salino. Otros investigadores reportaron un incremento producido por el NaCl, la expresión de ARNm y en la actividad de las enzimas Mn-SOD, APX, DHAR y GR, en chícharo cultivar Granada, mientras que en el cultivar sensible *Chillis*, no se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm ni en la actividad de las enzimas estudiadas (Hernández *et al.*, 2000).

Muy pocos trabajos se han hecho en el desarrollo de plantas transgénicas que sobreexpresen actividad enzimática antioxidante bajo estrés salino (Sairam y Tyagi, 2004). Roxas y colaboradores reportan la sobreexpresión en tabaco de la enzima glutatión-S-transferasa y GPX sometidas a una variedad de estreses. El tratamiento con estrés salino inhibe el crecimiento del genotipo silvestre y causó un incremento en la peroxidación lipídica, mientras que en las plantas transformadas no ocurrió peroxidación lipídica (Roxas *et al.*, 2000). Estudios con arroz transgénico que sobreexpresa la enzima SOD proveniente de levadura mostraron un incremento en los niveles de ascorbato peroxidasa y SOD cloroplástica en las plantas transformadas comparadas con el genotipo silvestre, mostrando a su vez mayor tolerancia a la salinidad.

Otros investigadores han estudiado el papel del sistema de la glioxalasa en la tolerancia

al estrés. El sistema de la glioxalasa es ubicuo en la naturaleza y consiste en dos enzimas, la glioxalasa I y II, que actúan coordinadamente para convertir el 2-oxoaldehído en 2-hidroxiácido, utilizando el glutatón reducido. Su función primaria parece ser, eliminar el metilglioxal, sustrato primario de la glioxalasa I, un compuesto tóxico conocido que disminuye el crecimiento y reacciona con el ADN y las proteínas. Plantas de tabaco se transformaron con ADN complementario de Gly I proveniente de *Brassica Juncea*. Las plantas transgénicas mostraron significativa tolerancia al estrés salino, lo que se correlacionó con el grado de expresión de Gly I. La inducción del gen de la glioxalasa I en respuesta al estrés salino y estrés osmótico, también se observó en tomate (Espartero *et al.*, 1995). Plantas transgénicas que sobreexpresan la glioxalasa mostraron un incremento en la tolerancia a la salinidad.

Papel del ABA en la tolerancia al estrés salino

ABA y la señalización del estrés abiótico

El ABA fue descubierto en la década de 1960, en frutos jóvenes de algodón, inicialmente con el nombre de abscisina. Desde entonces esta hormona se ha encontrado en gran número de especies de plantas. Las funciones del ABA más documentadas son: intervenir en los procesos de maduración de la semilla (Feurtado y Kermodé, 2007), adquisición de tolerancia a la desecación, dormancia de la semilla y retardo en su germinación, así como promover el cierre de los estomas. El ABA, en realidad, ayuda a las semillas a sobrepasar las condiciones de estrés y germinar solamente cuando las condiciones son propicias para la germinación y el crecimiento (Himmelbach *et al.*, 2003). El ABA también impide la germinación precoz de embriones prematuros.

Durante el crecimiento vegetativo el ABA es la principal hormona que confiere tolerancia al estrés abiótico, fundamentalmente a la salinidad y la sequía (Mahajan y Tuteja, 2005; Rosado *et al.*, 2006). El cierre estomático, promovido por el ABA, en condiciones de sequía, previene la pérdida de agua del interior de la célula y por tanto el ABA es llamada la hormona del estrés.

Los procesos que activan la síntesis de ABA y la inhibición de su degradación conllevan a la acumulación de ABA. Muchos genes involucrados en la biosíntesis del ABA se han clonado, los cuales incluyen la zeaxantina epoxidasa, conocido como ABA1 en *Arabidopsis* (Mari *et al.*, 1996), 9-cis-epoxicarotenoido dioxigenasa (NCED) (Tan *et al.*, 1997), ABA aldehído oxidasa y ABA3 conocido como LOS 5 (Xiong *et al.*, 2001). La ruta biosintética de esta hormona ha sido completamente dilucidada con la identificación del gen ABA4 que codifica para la enzima neoxantina sintasa, que parece esencial para la biosíntesis de novo del ABA durante el estrés hídrico (North *et al.*, 2007).

Se sabe que la salinidad, así como la sequía y el frío causan un incremento en la biosíntesis y acumulación del ABA, activando genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis del ABA, las cuales pueden ser catabolizadas al terminar el estrés. Muchos genes de respuesta al estrés son activados por el ABA, y este a su vez puede estimular la retroalimentación de los genes de su propia biosíntesis, aunque probablemente a través de fosfoproteínas dependientes de calcio (Rodríguez, 2005).

Desde el punto de vista de la tolerancia a la salinidad y otros tipos de estrés la función del ABA, parece ser la regulación del balance hídrico en la planta y la tolerancia al estrés osmótico.

Por otro lado numerosos experimentos indican que existen vías dependientes e inde-

pendientes de ABA para la inducción de los genes relacionados con el estrés abiótico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). La expresión inducida de ABA frecuentemente depende de la presencia de elementos que actúan en cis llamados ABRE, a los cuales se unen factores de transcripción bZIP conocido como proteínas que unen ABRE (AREB) o factores AREB (Wasilewska, et al., 2008). Análisis genéticos muestran que no está clara la línea divisoria entre las vías dependiente e independiente de ABA.

La aplicación del ABA a las plantas imita el efecto de una condición de estrés. Como muchos tipos de estrés abiótico conducen en última instancia a la desecación de la célula y a un desbalance osmótico, existe un solapamiento entre los patrones de expresión de los genes del estrés después del frío, la sequía, la salinidad y la aplicación del ABA. Esto también sugiere que varias señales del estrés y el ABA comparten elementos comunes en sus vías de señalización, y estos elementos comunes se entrelazan unos con otros para mantener la homeostasis (Leung y Giraudat, 1998).

Se han reportado estudios con numerosos mutantes de *Arabidopsis* deficientes de ABA, nombrados *aba1*, *aba2*, *aba3* (Koornneef et al., 1998) y *aba4* (North, 2007). También se han informado mutantes deficientes de ABA en especies como el tabaco, tomate y maíz (Liotenberg et al., 1999). Sin el tratamiento estresante, el crecimiento de estos mutantes es comparable con el fenotipo silvestre. Bajo estrés salino los mutantes muestran pobre crecimiento (Xiong et al., 2001). Los mutantes sometidos a estrés por sequía se marchitan rápidamente y mueren si el estrés persiste. Mientras que bajo estrés salino los mutantes deficientes de ABA muestran pobre crecimiento.

Los mutantes *abi1* y *abi2* de *Arabidopsis* son dominantes y mostraron insensibilidad al ABA exógeno durante la germinación. Estos

mutantes también exhiben mal funcionamiento de los estomas. Los genes *ABI1* y *ABI2* codifican las enzimas homólogas serina/treonina proteín fosfatasa 2C (Xiong y Zhu, 2001) y pueden tener funciones solapadas.

El papel del ABA en la tolerancia al estrés osmótico es bien conocido (Rock et al., 2000; Zhu, 2002) y también existen varias evidencias del papel del ABA en el control de la homeostasis iónica. Por ejemplo, el contenido de ABA se incrementó ligeramente solamente en las hojas de los cultivares de arroz tolerantes al salinidad versus los cultivares sensibles. Este incremento en el contenido de ABA se acompañó por una mejor razón K/Na (Bhora et al., 1995). También el transporte y la acumulación de K en raíces de plantas superiores está regulado por el ABA. Otros resultados indican que la actividad de los canales de K, regulada por el ABA en raíces de maíz y *Arabidopsis*, que la regulación de K en las raíces es, al menos en parte, mediada por el canal iónico.

Muchas plantas responden a los altos niveles salinos secuestrando iones dentro de la vacuola. Este proceso está mediado por un antiporte vacuolar Na/H que utiliza el gradiente protónico para concentrar iones en contra de su gradiente (Verma et al., 2007). Una caracterización de cinco antiportes de Na/H, mostró que dos transcriptos de ellos, *AtNHX1* y *AtNHX2*, se acumulan en respuesta al ABA. Sin embargo esta acumulación no ocurre en mutantes *aba1-2* indicando que la respuesta al estrés de estos genes depende del ABA (Yokoi et al., 2002). Se han aislado numerosos ADN complementarios que codifican para bombas iónicas de membranas tales como ATPasas y V-ATPasa. La acumulación de estos transcriptos se provoca debido a la salinidad, alguno de ellos siendo regulados por el ABA (Tsiantis et al., 1996). También es importante para la homeostasis iónica el incremento del Ca^{++} citoplasmático libre que es inducido por el ABA, un evento regulado

por la ADP ribosa cíclica (Wu *et al.*, 1997). La identificación de ARNm inducidos por el estrés o por el ABA, que codifican una proteína de membrana que se une al calcio (Fransen *et al.*, 1996) y una fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol en *A. thaliana* (Hirayama *et al.*, 1995), respectivamente, proporcionan evidencia indirecta de la participación del calcio en la señalización del ABA en tejidos vegetativos. El aislamiento del gen RD20, una proteína que une el calcio que está inducida por el ABA y el estrés salino, sugiere una relación entre el estrés salino, el ABA y las vías señalizadoras del calcio.

Como hemos dicho en capítulos anteriores, los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de prolina, glicín betaína y el el pinito/ononitol, se expresan en varias especies de plantas como respuesta al estrés salino. El gen P5CS, involucrado en la biosíntesis de la prolina a partir del glutamato, se acumula en *Oryza sativa* y *A. thaliana* en respuesta al estrés salino y al ABA (Sairam y Tyagi, 2004).

Algunos de los genes encargados de la respuesta a la salinidad son aquellos que codifican proteínas involucradas en la regulación de otros genes de respuesta a la salinidad. Los genes reguladores son en su mayoría factores de transcripción y proteínas quinasas. En *Arabidopsis thaliana*, la expresión del gen del receptor semejante a proteína quinasa se induce en respuesta a la salinidad y al ABA (Mahajan y Tuteja, 2005).

Otro gen que codifica la fosfolipasa C específica del fosfatidil inositol, se expresa en respuesta a la salinidad y a la sequía. Esta enzima hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, para producir inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol. El IP3 abre los canales de Ca^{2+} en la membrana del retículo endoplasmático, causando el eflujo de este catión hacia el citoplasma. Este gen

también se expresa en presencia del ABA (Mahajan y Tuteja, 2005).

El IP3 tiene una función crucial en las oscilaciones citosólicas del Ca^{2+} durante la señalización del ABA y el estrés salino. Los análisis de expresión transiente revelaron que el IP3 y los canales de Ca^{2+} , activados por la ADP ribosa cíclica, participan en las oscilaciones citosólicas del Ca^{2+} mediadas por el ABA. Esta hormona induce la expresión y actividad de la enzima ADP ribosil ciclasa, la cual sintetiza la ADPIC. Se ha demostrado además, la relación de una proteína G heterotrimérica, en la transducción de la señal del ABA durante la regulación de las células acompañantes (Chinnusamy *et al.*, 2005)

El análisis genético de los mutantes deficientes de ABA *los5/aba3* y *los6/aba1* de *Arabidopsis* mostró que el ABA juega un papel central en la expresión de genes regulados por el estrés osmótico (Xiong, 2001). La expresión de los genes de respuesta al estrés tales como RD29A, RD22, COR15A, COR47 y P5CS se redujo severamente o se bloqueó completamente en el mutante *los5*; mientras que en *los6*, la expresión de RD29A, RD19, COR15A, COR47, KIN1 y ADH, fue menor que en el fenotipo silvestre. Por tanto se plantea que la vía dependiente de ABA tiene una función esencial en la expresión de los genes de respuesta al estrés osmótico.

Consideraciones finales

La aplicación de la ingeniería genética en el mejoramiento de los cultivos para su tolerancia a la salinidad es decisiva para la producción de alimentos y la seguridad alimentaria de la humanidad. Sin embargo el progreso obtenido en este sentido ha sido limitado, por la carencia de un conocimiento completo de las bases moleculares de la

tolerancia y la poca disponibilidad de genes que confieren tolerancia al estrés.

Aunque el progreso en el mejoramiento de la especies cultivadas para su tolerancia al estrés salino ha sido lento, existen razones considerables para el optimismo. Estas incluyen el desarrollo reciente en el área de la biología molecular vegetal, específicamente el desarrollo de marcadores moleculares (Owuso, 2008), el secuenciamiento de genomas completos de plantas modelo tales como *Arabidopsis*, la disponibilidad de herramientas para la aplicación de la genética reversa, que ofrecen soluciones a las complejas interrogantes que plantea la tolerancia de las plantas al estrés salino (Hussain, 2008).

Desafortunadamente, a pesar de los grandes avances alcanzados, aun permanecen muchas interrogantes por responder, en relación con la respuesta de la planta frente a la salinidad, por lo cual se impone continuar los esfuerzos encaminados a lograr mayores progresos en la comprensión de estos fenómenos, como una vía para la obtención de plantas tolerantes y lograr la disminución de los perjudiciales efectos que la salinidad provoca en la producción agrícola internacional.

Bibliografía

- Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC, 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131: 1748-1755.
- Ahmad I, Larhar F, Stewart GR, 1979. Sorbitol: a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytol.* 82: 671-678.
- Amini F, Ehsanpour AA, Hoang QT, Shin JS, 2007. Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology.* 54 (4): 464-472.
- Amtmann A, Sanders D, 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research.* 29: 75-113.
- Anil VS, Krishnamurthy H, Mathew MK, 2007. Limiting cytosolic Na⁺ confers salt tolerance to rice cells in culture: a two-photon microscopy study of SBFI-loaded cells. *Physiologia Plantarum* 129, 607-621.
- Apse MP, Blumwald E, 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 146-150.
- Arakawa K, Katayama M, Takabe T, 1990. Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol.* 31: 797-803.
- Ashrat M, 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science.* 13: 17-42.
- Bargmann BOR, Laxalt AM, Riet B, Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D, Munnik T, 2009. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol.* 50(1): 78-89.
- Barkla BJ, Pantoja O, 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology.* 47: 159-184.
- Bartels D, Ramanjulu S, 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Plant Sci.* 24, 23-58.
- Berthomieu PG, Conejero A, Nublát W, Brackenburg C, Lambert C, Savio N, Uozumi S, Oiki K, Yamada, Cellier F, 2003. Functional analysis of At A HKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
- Bhora JS, Dooffling H, Dooffling K, 1995. Salinity tolerance of rice with reference to endogenous and exogenous abscisic acid. *J. Agron. Crop. Sci.* 174: 79-86.
- Bohnert HJ, Nebson DW, Jensen RG, 1995. Adaptation to environmental stress. *Plant Cell.* 7: 1099-1111.

- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA, 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell and Organ Culture*. 23: 1001-115.
- Boston R, Viitanen P, Vierling E, 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 191-222.
- Caldevia HDQM, Caldevia G, 1999. Free polyamine accumulation in unstressed and NaCl stressed maize plants. *Agron. Lusit.* 47, 209-215.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C, 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103(4): 551-560.
- Chen MQ, Wei HB, Cao JW, Liu RJ, Wang YL, Zheng CY, 2007 Expression of bacillus subtilis *proBA* genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 396-403.
- Chen T, Murata N, 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Plant Biol.* 5. 250-257.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J, 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45, 437-448.
- Cuartero J, Bolarín MC, Asíns MJ, Moreno V, 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57(5): 1045-1058.
- Cuartero J, Yeo AR, Flowers TJ, 1992. Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *The New Phytologist*, 121: 63-69.
- Cushman JC, 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *Am. Zool.* 41, 758-769.
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB, 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant. Physiol.* 141: 330-335.
- Demidchik V, Maathuis FJM, 2007. Physiological roles of non selective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* 18, 387-404.
- Demidchik V, Tester M, 2002. Sodium fluxes through non selective cation in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 128. 379-387.
- Donalson L, Ludidi L, Knigh Mr, Gehring C, Denby K, 2004. Salt and osmotic stress cause rapid increases in *Arabidopsis thaliana* cGMP levels. *FEBS Letters.* 569: 17-320.
- Espinosa-Ruiz A, Belles JM, Serrano R, Culiañez-Macia FA, 1999. *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *The Plant Journal*, 20: 529-539.
- Estafandiari E, Shekari F, Shekari F, Estafandiari M, 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Not. Bot. Hort. Agobot. Cluj.* 35(1): 48-55.
- Evangelou VP, 1994. Influence of sodium on soils of humid regions. En: *Handbook of Plant and Crop Stress* (M. Pessarakli, ed) Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 31-62.
- Feurtado JA, Kermod AR, 2007. A merging of paths. In *Abscisic Acid and Hormonal Cross-Talk in the Control of Seed Dormancy Maintenance and Alleviation*, Bradford, K, and Nonogaki H, eds (Oxford, UK: Blackwell Publishing), Chapter 8. pp. 176-211.
- Flowers TJ, Colmer TD, 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179, 945-963.
- Frandsen G, Muller-Uri F, Nielsen M, Mundy J, Skriver K, 1996. Novel plant Ca(2+)-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 271: 343-348.
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y, 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45, 146-159.

- García M, Medina E, 2003. Crecimiento y acumulación de prolina en dos genotipos de caña de azúcar sometidos a salinización con cloruro de sodio. *Agronomía Colombiana*. 20: 168-179.
- Gimmler H, 2000. Primary sodium plasma membrane ATPases in salt-tolerant algae: facts and fictions. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1171-1178.
- Gülen H, Çetinkaya C, Kadyoölu M, Kesici M, Cansev A, Eri A, 2008. Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation in Strawberry (*Fragaria X ananassa*) Plants Under Low Temperature. *J. Biol. Environ. Sci.* 2(6), 95-100.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ, 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.
- Hayashi H, Alia Mustardy L, Deshniem P, Ida M, Murata N, 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12: 133-142.
- Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux, Sevilla PF, 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Biol.* 23: 853-862.
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E, 2003. Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 470-479.
- Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, Shinozaki K, 1995. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3903-3907.
- Holmstrom KO, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B, 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* 51: 177-185.
- Hong B, Barg R, Ho TH, 1992. Developmental and organ-specific expression of an ABA- and stress-induced protein barley. *Plant Mol. Biol.* 18: 663-674.
- Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, Shinmyo A, 2001. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *The Plant Journal*, 27, 129-138.
- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G, 2000. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* 122: 747-756.
- Hung SH, Yu CW, Lin CH, 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.
- Hur J, Jung KH, Lee CH, An H, 2004. Stress-inducible *osp5cs2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*. 167: 417-426.
- Hussain TM, Chandrasekhar T, Hazara M, Sultan Z, Saleb BK, Gopal GR, 2008. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* 3 (1): 8-13.
- Iyer S, Caplan A, 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.* 116: 203-211.
- Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK, 2006. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics*. 85 (3): 237-245.
- Kalampanayil BD, Wimmers LE, 2001. Identification and characterization of salt-stress-induced plasma membrane H⁺-ATPase in tomato. *Plant, Cell and Environment*. 24: 999-1005.
- Kalembe EM, Pukacka S. Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biological Lett*, 2007. 44(1): 3-16.
- Karakas B, Ozias-Akins P, Stushnoff C, Suefferheld M, Rieger MJ, 1999. Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* 20: 609-616.
- Kasubaba Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara S, 2004. Overexpression of spermidine synthase

- enhances tolerance to multiple environmental stresses and up regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* 45: 712-722.
- Kellös T, Timár I, Szilágyi V, Szalai G, Galiba G, Kocsy G, 2008. Effect of abiotic stress on antioxidants in maize. *Acta Biologica Szegediensis.* 52(1): 173-174.
- Kishor KB, Hong Z, Miso GH, Hu CA, Verma DP, 1995. Overexpression of D-xylose-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plant. *Plant. Physiol.* 108: 1387-1394.
- Klimecka M, Muszynska G, 2007. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica.* 54(2): 219-233.
- Koornneef M, Leon-Kloosterziel KM, Schwartz SH, Zeevaart JAD, 1998. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 83-89.
- Koprivova A, North KA, Kopriva S, 2008. Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology.* 146: 1408-1420.
- Kore-eda S, Cushman MA, Akselrod I, Bufford D, Fredrickson M, Clark E, Cushman JC. 2004. Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Gene.* 27: 83-92.
- Kuo TM, Doehlert DC, Crawford CG, 1990. Sugar metabolism in germinating soybean seeds. *Plant Physiol.* 93: 1514-1520.
- Larcher W, 2003. *Physiological plant ecology.* 4th ed. Springer, Germany. 231 p.
- Laurie E, Feeney K, Maathuis F, Heard P, Brown S, Leigh R, 2002. A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *The Plant J.* 32(2): 139-154.
- Leidi O, Pardo JM, 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias, Secretaría de Investigaciones, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, N° II; <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev2/5.htm>*
- Leung J, Giraudat J, 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222.
- Li QL, Gao XR, Yu XH, Wang XZ, An LJ, 2003. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnol. Lett.* 25: 1431-1436.
- Liljus G, Holmberg N, Bulow L, 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase.
- Lin CC, Kao CH, 1995. Levels of endogenous polyamines and NaCl inhibited growth of rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 17: 15-20.
- Liotenberg S, North H, Marion-Poll A, 1999. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant. Physiol. Biochem.* 37: 341-350.
- Liu J-H, Nada K, Honda C, Kitashiba H, Wen X-P, Pang X-M, Moriguchi T, 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *J. Exp. Bot.* 57: 2589-2599.
- Liu X, Hua X, Guo J, Qi D, Wang L, Liu Z, Jin Z, Chen S, Liu G, 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett.* 30: 1275-1280.
- Maathuis FJM, Sanders D, 2001. Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiology.* 127: 1617-1625.
- Mahajan S, Tuteja N, 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 444: 139-158.
- Mani S, van de Cotte B, van Montagu M, Verbruggen N, 2002. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to pro-

- line and its analogs in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128: 73-83.
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 15: 2331-2342.
- Marschner H, 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press Ltd, London.
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirsch K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Gueriot ML, 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126: 1646-67.
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis JD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA, 2008. Spermidine Exodus and Oxidation in the Apoplast Induced by Abiotic Stress Is Responsible for H₂O₂ Signatures That Direct Tolerance Responses in Tobacco. *The Plant Cell.* 20: 1708-1724.
- Munns R, 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant. Cell. Environ.* 25, 239-250.
- Munns R, Tester M, 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology.* 59: 651-681.
- Munns R, James RA, Lauchli A, 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany.* 57(5): 1025-1043.
- Murata Y, Katsura S, Obi I, Kakutani T, 2000. Alterations in Ca²⁺-binding on plasma membrane after adaptation to salt stress of tobacco cells in suspension. *Plant and Cell Physiology* 41: 1286-1292.
- Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinzaki K, 2003. Toxicity of free proline revealed in an Arabidopsis T-DNA tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 44: 541-548.
- Nayyar H, 2003. Variation in osmoregulation in differentially drought-sensitive wheat genotypes involves calcium. *Biol.Plant.* 47 (4), 541-547.
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A, 2007. The Arabidopsis ABA deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J.* 50, 810-824.
- Owuso K, 2008. Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *African Journal of Biotechnology.* 7(4): 331-341.
- Parida AK, Das AB, 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 60: 324-349.
- Parvaiz A, Satyawati S, 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environ.* 54, (3): 89-99.
- Penna S, 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* 8: 355-357.
- Pilon-Smits E, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, Van Dun K, Voodg E, Verwoerd T, Krutwagen R, Goddijn O, 1998. The Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol.* 152: 525-532.
- Pommerrenig B, Papini-Terzi FS, Sauer N, 2007. Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiol.* pp.106-151.
- Ray V, 2002. Role of amino acids in plants responses to stresses. *Biol. Plant.* 45(4), 481-487.
- Rengel Z, 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment*, 15: 625-632.
- Rhodes D, Hanson AD, 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in

- higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.
- Rock CD, 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357-396.
- Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O, 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biocnología Aplicada.* 22: 1-10.
- Rodríguez-Navarro A, 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1469: 1-30.
- Rosado A, Amaya I, Valpuesta V, Cuartero J, Botella MA, Borsani O, 2006. ABA- and ethylene-mediated responses in osmotically stressed tomato are regulated by the TSS2 and TOS1 loci. *Journal of Experimental Botany.* 57(12): 3327-3335.
- Roxas VP, Sundus AL, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD, 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that over express glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41: 1229-1234.
- Roy M, Wu R, 2000. Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Sci.* 160: 869-875.
- Roychoudhury A, Roy C, Sengupta DN, 2007. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene Rab16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Resp.* 26(10): 1839-1859.
- Roychoudhury A, Basu S, 2008. Overexpression of an abiotic-stress inducible plant protein in the bacteria *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (18), pp. 3231-3234.
- Rubio L, Rosado A, Linares-Rueda A, Borsani O, García-Sánchez M, Valpuesta V, Fernandez JA, Botella MA, 2004. Regulation of K^+ transport in tomato roots by the *tss1* locus implications in salt tolerance. *Plant Physiology.* 134: 452-459.
- Rus A, Lee B, Muñoz A, Sharkhuu A, Zhu J, Bresnan R, Hasegawa P, 2004. AtHKT1 facilitates Na^+ homeostasis and K^+ nutrition in planta. *Plant Physiol.* 136, 2500-2511.
- Sairam RK, Srivastava GC, 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress. *Plant Sci.* 162: 897-904.
- Sairam RK, Deshmukh PS, Shukla DS, 1997. Tolerance to drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 171-177.
- Sairam RK, Tyagi A, 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science.* 86(3): 407-421.
- Sakamoto A, Alia A, Murata N, Murata A, 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant. Mol. Biol.* 38: 1011-1019.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF, 2002. Calcium at the crossroads of signaling, *Plant Cell* 14 (suppl.) S401-S417.
- Senadheera P, Singh RK, Maathuis FJM, 2009. Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. *Journal of Experimental Botany Advance Access published April 24, 2009.* 1-11.
- Senthilkulmar P, Jithesh MN, Parani M, Rajalashmi S, Praseetha K, Parida A, 2005. Salt stress effects on the accumulation of vacuolar H-ATPase subunit c transcripts in wild rice. *Current Science.* 89(8): 1386-1393.
- Serraj R, Sinclair T, 2002. Osmolyte accumulation: Can it really help increase in crop yield under drought conditions? *Plant. Cell. Environ.* 25, 333- 341.
- Shi H, Lee B, Wu S, Zhu J, 2003. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* 21. 81-85.
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK, 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings National Academy of Sciences USA,* 97: 6896-6901.

- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 221-227.
- Sirichandra C, Wasilewska A, Vlad F, Valon C, Leung J, 2009. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *Journal of Experimental Botany* 60(5):1439-1463.
- Su J, Chen PL, Wu R, 1999. Transgene expression of mannitol-1-phosphate dehydrogenase enhanced the salt stress tolerance of the transgenic rice seedlings. *Sci. Agric. Sin*, 32, 101-103.
- Sugino M, Hibino T, Tanaka Y, Nii N, Takabe T, Takabe T, 1999. Overexpression of *DnaK* from a halotolerant cyano-bacterium *Aphanothece halophytica* acquires resistance to stress in transgenic tobacco plants. *Plant Sci.* 146: 81-88.
- Sul H, Balderas E, Vera-Estrella R, Golladack D, Quigley F, Zhao C, Pantoja O, Bohnert H, 2003. Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant. Mol. Biol.* 52, 967-980.
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JAD, Mc-Carty DR, 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12235-12240.
- Tarczynski M, Jensen R, Bohnert H, 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Tester M, Davenport R, 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91, 503-527.
- Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JA, 1996. Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H(1) ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* 9: 729-736
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 113-122.
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, García-Ramírez L, Pantoja O, 2005. Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* 139: 1507-1517.
- Verma D, Singla-Pareek SL, Rajagopal D, Reddy MK, Sopory SK, 2007. Functional validation of a novel isoform of Na⁺/H⁺ antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. *J. Biosci.* 32(3): 621-8.
- Vernon DM, Bohnert HJ, 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophytes *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* 11: 2077-2085.
- Vijayan K, 2009. Approaches for enhancing salt tolerance in mulberry (*Morus L*) -A review. *Plant Omics Journal.* 2(1): 41-59.
- Vinocur B, Altman A, 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitation. *Curr. Opin. Biotechnology.* 16: 123-132.
- Vitam Vas P, Kosava K, Prasil I, 2007. Proteome analysis in plant stress research. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 43 (1): 1-6.
- Wang SM, Zhang JL, Flowers TJ, 2007. Low-affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Physiology* 145, 559-571.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A, 2004. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends. Plant. Sci.* 9: 244-252.
- Wasilewska A, Florina V, Sirichandra C, Redkob Y, Jammesc F, Valona C, Frei N, Leunga F, 2008. An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More... *Molecular Plant.* 1 (2), 198-217.
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH, 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in *Arabidopsis* in plants. *Science* 278: 2126-2130.
- Xiong L, Zhu JK, 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112: 152-166.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho TH, Wu R, 1996. Differential expression *HVA 1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt of salt- stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110: 249-257.

- Yeo AR, 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 915-929.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM, 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporter in the salt stress response. *Plant J.* 30: 529-539.
- Zhao J, Barkla B, Marshall J, Pittman JK, Hirschi KD, 2008. The *Arabidopsis* cax3 mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 227, 659-669.
- Zhou S, Wei S, Boone B, Levy S, 2007. Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. *African Journal of Environmental Science and Technology*. Vol. 1 (2): 014-026.
- Zhu JK, 2002. Salt drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53: 247-273.
- Zhu BC, Su J, Chang MC, Verma DPS, Fan YL, Wu R, 1998. Over expression of a delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci.* 139, 41-48.
- Zhu JK, 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124, 941-948.
- Zhu JK, 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Plant Biol.* 6, 441-445.
- (Este artículo científico fue aprobado por el Consejo Editorial del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov" en fecha 15 de Noviembre de 2008 y no ha sido publicado con anterioridad en ningún tipo de publicación)
- (Aceptado para publicación el 2 de julio de 2009)

Sales y nitrato exportados el drenaje de los regadíos de Bardenas

J. Causapé

Instituto Geológico y Minero de España (IGME)
C/ Manuel Lasala nº 44. 9ºB. 50006 Zaragoza
Tf: 34 - 976 555 282, Fax: 34 - 976 55 33 58
E-mail: j.causape@igme.es; web site: www.jcausape.es

Resumen

Cuantificar la evacuación de contaminantes agrarios a través del agua drenaje en zonas regadas permite asignar esa pérdida a la superficie de regadío de la que proviene. Ello resulta imprescindible para la aplicación de una legislación basada en máximos permisibles de masas de contaminantes exportados. Como continuación a la evaluación del aprovechamiento del agua, esta segunda parte del estudio pretende evaluar la contaminación inducida por las 59.200 ha regadas de Bardenas incluidas en la cuenca del Arba.

Para ello, se ejecutaron balances de masas (sales y nitrato) asignando valores de concentración a cada uno de los componentes del balance hídrico en el periodo 2004-2007. Asimismo, se analizó la evolución de índices de contaminación por sales (ICS) y nitrato (ICN) que corrigen la masa de contaminantes exportada por la salinidad y necesidades de fertilización del regadío estudiado.

Los ICS e ICN disminuyeron de 2004 a 2007 un 15% y un 23% respectivamente, situándose por efecto de la reutilización del agua de drenaje, en valores un 60% inferior a los obtenidos en pequeñas cuencas del mismo regadío. El ICS fue similar al de modernos regadíos bien gestionados aunque el ICN fue un 24% superior.

Los resultados indicaron escasas posibilidades de disminuir más la contaminación por sales pero una necesidad de adecuar el manejo combinado del riego y fertilización de tal forma que se minimice la contaminación por nitratos, algo que en Bardenas no es fácil de conseguir por la presencia mayoritaria de suelos inadecuados para el riego por inundación que no permite un control suficiente de las fechas-dosis de agua y nitrógeno a aplicar.

Palabras clave: Vigilancia agroambiental, regadío, índices, contaminación, agua.

Summary

Salts and nitrates exported in the Bardenas drainage

The loss of agricultural pollutants through drainage can be related to the irrigated land of the hydrological basin and therefore it is possible to establish a legislation based on maximum allowed values of pollutant exported loads.

As a continuation of the evaluation of water use, this second part of the study evaluates the contamination induced by the 59.200 ha of irrigated land in the Bardenas irrigation district, which belongs to the Arba basin.

Mass balances (salt and nitrate) were accomplished, assigning concentration values to each one of the water balance components in the period 2004-2007. The Salt Contamination Index (ICS) and the Nitrate Contamination Index (ICN) were analyzed; these indices correct the unitary mass of pollutants exported by the salinity and fertilization needs of the studied irrigated land.

The ICS and ICN decreased, respectively, 15% and 23% from 2004 to 2007, as an effect of the drainage water reuse, these indices presented values 60% lower than the ones obtained in small basins of the

same Irrigation District. The ICS values were similar to the new irrigation lands with good management, but the ICN values were 24% higher.

The results showed little possibilities to reduce the salt contamination as well as the necessity to adequate the combination of irrigation and fertilization management, as a way to minimize the nitrates pollution. This will not be easy to achieve in Bardenas because of the presence of inadequate soils for flood irrigation, which does not allow sufficient control of the application of water and nitrogen.

Key words: Agro-environmental monitoring, irrigation, indices, pollution, water.

Introducción

Una agricultura de regadío sostenible exige, entre otras cosas, que las sales no queden acumuladas en los suelos impidiendo el desarrollo normal de los cultivos, por lo que es necesaria su evacuación produciendo un incremento en la salinidad de los sistemas receptores (ríos y acuíferos).

Los cambios que sufre el agua en la composición química por su evapoconcentración y la disolución de sales presentes en el suelo, pueden llegar a ser tan importantes como para no permitir su uso posterior en otras actividades agrarias, industriales, urbanas o ecológicas (Jiménez y Lamo de Espinosa, 1998).

La Agencia Estadounidense de Protección del Medioambiente identifica a la agricultura como la principal fuente de contaminación de las aguas (www.epa.gov). Mención especial merece la contaminación inducida por nitratos de origen agrario ya que la Organización Mundial de la Salud identifica como un problema muy importante la presencia de nitratos derivados de la fertilización nitrogenada en las aguas superficiales y subterráneas (OMS, 2004).

La necesidad de producir mayores cantidades de alimentos fomentó la aplicación de fertilizantes minerales nitrogenados para aumentar las cosechas hasta alcanzar los rendimientos deseados (Betrán, 2006). Pero las altas tasas de nitrato en ríos o mares también está causando graves efectos medioam-

bientales, provocando la aparición de zonas anóxicas y la eutrofización de los medios acuáticos, como se evidencia en las costas de los Estados Unidos (Scavia y Bricker, 2006) o China (Wang, 2006).

Así pues, la contaminación de los ecosistemas acuáticos receptores de retornos de riego es un problema creciente en muchos países ante la implantación de mayores áreas destinadas a la agricultura de regadío (FAO, 2002).

La legislación europea actual en materia de aguas tan solo hace referencia a niveles de contaminación basados en concentración de contaminantes (EU, 1998) y no en la masa exportada a través del drenaje, que es verdaderamente el parámetro que se debe controlar para minimizar las afecciones medioambientales negativas hacia los ecosistemas acuáticos que se desee proteger. Este vacío legal esta justificado en parte, por la particularidad que entraña el carácter difuso de la contaminación inducida por el regadío, y por tanto, por su dificultad para cuantificarla y atribuirla a un determinado territorio. Sin embargo, una vez comprobado el adecuado cierre del balance hídrico de una cuenca hidrológica que confirme la consideración de todos los componentes y su correcta medición, la pérdida de contaminantes agrarios a través de su drenaje puede ser asignada al regadío incluido en dicha cuenca y con ello, aplicar una legislación basada en máximos permisibles de masas de contaminantes exportados en relación con las características

particulares de cada regadío (clima, geología y agronomía).

El seguimiento de cuencas hidrológicas de regadío se ha aplicado con éxito en pequeñas cuencas del valle del Ebro donde los principales problemas de contaminación agraria son los derivados de la salinización y elevada concentración de nitrato en las aguas (Causapé *et al.*, 2006). Las masas de sales exportadas por los regadíos del Ebro son ampliamente variables oscilando entre las 4 t/ha·año en suelos no salinos de zonas como Bardenas I (Causapé *et al.*, 2004) y las 20 t/ha·año en los suelos con abundante yeso y regados por inundación en Monegros I (Isidoro *et al.*, 2006a).

En cuanto al nitrato, la masa exportada por los regadíos del Ebro oscila entre los 30 kg N-NO₃⁻/ha·año (Cavero *et al.*, 2003) en zonas con alta eficiencia del riego y de aplicación de fertilizantes nitrogenados y los casi 200 kg N-NO₃⁻/ha·año (Causapé *et al.*, 2004) en casos contrarios, pudiendo desperdiciarse hasta la mitad del fertilizante nitrogenado aplicado.

Como continuación a la evaluación del aprovechamiento del agua en Bardenas (Causapé *et al.*, 2009), esta segunda parte pretende: i) cuantificar la masa de contaminantes agrarios (sales y nitrato) exportados por los regadíos de Bardenas incluidos en la cuenca del Arba (59.200 ha); ii) analizar los factores más influyentes sobre la masa de contaminantes exportada y iii) evaluar la contaminación inducida por el regadío.

Metodología

Tanto la descripción del área de estudio como el desarrollo de los balances de agua previos a esta segunda parte se presentan en la primera parte del trabajo (Causapé *et al.*, 2009).

En esta segunda parte, se continuó el estudio mediante la ejecución de balances de masas de los principales contaminantes de origen agrario de la cuenca del Ebro. Con la ayuda de la aplicación informática EMR (Evaluador agroambiental de Regadíos; Causapé, 2008) se asignaron valores de concentración de sales y nitrato a cada uno de los componentes del balance hídrico (2004-2007), excepto a la evapotranspiración y a las pérdidas por evaporación y arrastre por el viento del riego por aspersión que se consideraron libres de contaminantes. El producto entre concentraciones y volúmenes de agua otorgó la masa de sales y nitrato para cada componente del balance.

La diferencia entre las entradas (E: P-Precipitación, R-Riego, EL-agua destinada a generar electricidad y posteriormente vertida al Arba sin uso para riego, AP-abastecimiento a pequeñas poblaciones, DP-vertido de la depuradora, agua por los ríos RI-Riguel, AL-Arba de Luesia, AB-Arba de Biel y RS-Resto del secano) y salidas (S: AT-Arba en Tauste, AC-Acequias laterales, SB-Flujos subterráneos) se atribuyeron al resultado de los componentes no tenidos en cuenta y a los errores asociados al balance. Así pues, los balances de masas estuvieron descritos por la siguiente ecuación:

$$(P+R+EL+AP+DP+RI+AL+AB+RS) - (AT+AC+SB) = E - S \quad [\text{Ec. 1}]$$

La masa de sales (D_S) y nitrato (D_N) exportada a través del drenaje propio del sistema se calculó como:

$$DS/N = (AT+AC+SB) - (EL+AP+DP+RI+AL+AB+RS) \quad [\text{Ec. 2}]$$

La conductividad eléctrica a 25° (CE) y la concentración de nitrato ([NO₃⁻]) de P fue estimada mensualmente a partir de los valores medios registrados en el periodo 1988-2000 en la estación que el European Monitoring and Evaluation Program (EMEP, 2008) tiene en Logroño. Los Sólidos Disuel-

tos Totales (SDT) para este componente fueron estimados indirectamente a través de la relación generalmente aceptada:

$$\text{SDT (mg/l)} = 640 \cdot \text{CE (dS/m)} \\ \text{(Bower y Wilcox, 1965)}$$

La concentración del agua del canal de Bardenas se aplicó a R, EL, y AP. Se tomaron 9 muestras de agua en las que se determinó la CE y $[\text{NO}_3^-]$ además del residuo seco y la concentración de bicarbonato ($[\text{HCO}_3^-]$) necesarios para la estimación de los SDT.

$$\text{SDT (mg/l)} = \text{Residuo Seco (mg/l)} + \\ + \frac{1}{2} \text{HCO}_3^- \text{ (mg/l)}; \text{ (Custodio, 1983) [Ec. 3]}$$

Como la salinidad y concentración de nitrato del agua del Canal de Bardenas fue muy constante ($\text{CV}_{\text{SDT}} = 9\%$), se optó por introducir durante todo el periodo del balance los valores medios de las 9 muestras analizadas ($\text{SDT} = 275 \text{ mg/l}$, $[\text{NO}_3^-] = 2 \text{ mg/l}$).

En cambio, para RI, AL y AB de mayor variabilidad temporal ($\text{CV}_{\text{RI}} = 47\%$, $\text{CV}_{\text{AL}} = 21\%$, $\text{CV}_{\text{AB}} = 21\%$) se estableció la relación CE (dS/m) vs. SDT (mg/l) y fue aplicada a muestreos trimestrales donde únicamente se determinó la CE y $[\text{NO}_3^-]$.

$$\text{SDT}_{\text{RI}} = 769 \cdot \text{CE}_{\text{RI}} - 1; \\ n = 11; R^2 = 0,99 \quad \text{[Ec. 4]}$$

$$\text{SDT}_{\text{AL}} = 639 \cdot \text{CE}_{\text{AL}} + 74; \\ n = 10; R^2 = 0,93 \quad \text{[Ec. 5]}$$

$$\text{SDT}_{\text{AB}} = 819 \cdot \text{CE}_{\text{AB}} - 31; \\ n = 10; R^2 = 0,92 \quad \text{[Ec. 6]}$$

La CE y $[\text{NO}_3^-]$ de RS se estimó como la media de RI, AL, y AB (cuencas mayoritariamente de secano). La concentración de DP fue facilitada mensualmente por el Instituto Aragonés del Agua (Gobierno de Aragón).

La importancia y variabilidad de la concentración de AT condicionó la instalación de un tomamuestras automático (ISCO 3700C) que posibilitó una frecuencia de muestreo diaria y el posterior análisis en laboratorio

de la CE y $[\text{NO}_3^-]$. La relación CE-SDT se estableció a partir de 27 muestras:

$$\text{SDT}_{\text{AT}} = 711 \cdot \text{CE}_{\text{AT}} - 20; \\ n = 27; R^2 = 0,99 \quad \text{[Ec.7]}$$

Para el resto de componentes de salida se realizó un menor esfuerzo de muestreo. Así, a AC se asignó la concentración media de 3 muestras tomadas en la acequia ($\text{SDT} = 850 \text{ mg/l}$; $[\text{NO}_3^-] = 25 \text{ mg/l}$) y a SB la concentración media de 3 muestras tomadas en un manantial cercano a la estación de aforos del Arba en Taus-te ($\text{SDT} = 1.758 \text{ mg/l}$; $[\text{NO}_3^-] = 61 \text{ mg/l}$).

El impacto agroambiental se cuantificó en base a los Índices de Contaminación por Sales (ICS) y por nitrato (ICN) propuestos por Causapé (2008). Ambos índices dividen las masas unitarias de contaminantes exportados por factores hasta cierto punto de influencia "natural" como son la geología y las posibilidades agronómicas de un determinado regadío.

Así, el ICS se define como la relación entre sales exportadas (D_s) y la CE media del drenaje en periodo de no riego (CE_{NR}), parámetro representativo de la salinidad de los materiales geológicos de la zona. Por otro lado, el ICN se calculó como el nitrato exportado en el drenaje (D_N) entre las necesidades de fertilización nitrogenada del sistema (NF).

$$\text{ICS} = \frac{D_s}{\text{CE}_{\text{NR}}} \quad \text{[Ec. 9]}; \quad \text{ICN} = \frac{D_N}{\text{NF}} \quad \text{[Ec.10]}$$

Las NF se calcularon anualmente a partir de las superficies de cultivos, las producciones medias de la zona (Estadística agraria. www.aragon.es) y las extracciones de nitrógeno en las cosechas (Orús y Sin, 2006), salvo para las leguminosas que por su capacidad de fijar simbióticamente el nitrógeno se consideró $\text{NF} = 0$.

Resultados

Sales

A pesar de que el agua del canal de Bardenas fue de baja mineralización (275 mg/l), el 60% de las sales introducidas en el sistema lo hicieron a través del agua de riego llegando a constituir el 75% de las entradas de 2005 (tabla 1). Los aportes de sales procedentes del exterior al área regable evaluada (RI, AL, AB, y RS) constituyeron el 25% de las entradas, oscilando entre el 32% del lluvioso año 2004, y tan

sólo el 15% del seco 2005. EL supuso el 8% de las entradas concentrándose únicamente en los años más lluviosos (2004 y 2007). La aportación del resto de entradas fue significativamente inferior (P= 3% AP= 3% y DP= 1%).

En cuanto a las salidas, el 98% se produjeron a través de AT mientras que AC (2%) y SB (1%) tan sólo contribuyeron en un 3%. La CE media de las muestras diarias recogidas en AT fue de 3,04 dS/m (CV= 43%), si bien, una vez ponderadas por el volumen de agua, la CE media de AT fue inferior (2,24 dS/m). Un 90% de las muestras colectadas estuvo por

Tabla 1. Entradas (R-Riego, P-Precipitación, RI-Riguel, AL-Arba de Luesia, AB-Arba de Biel, RS-Resto Secano, EL-agua destinada a generar electricidad y posteriormente vertida al Arba sin uso para riego, AP-Abastecimiento a pequeñas poblaciones, y DP-Depuradora de Ejea), Salidas (AT-Arba en Tauste, AC-Acequias laterales que puentean la estación del Arba en Tauste, SB-flujo subterráneo a través del aluvial del Arba), diferencia entre entradas y salidas del balance de sales desarrollado en el área regable incluida en la cuenca del Arba para los cuatro años de estudio (2004-2007)

Table 1. Inputs (R-Irrigation, P-Precipitation, RI-Riguel, AL-Arba de Luesia, AB-Arba de Biel, RS-Rainfed land, EL- Water used to generate electricity and then disposed into the Arba river without being used for irrigation, AP-Water supply to small villages, DP- Sewage treatment plant of Ejea), Outputs (AT-Arba Tauste, AC-Lateral channel in Arba Tauste, SB-Groundwater flow through Arba aquifer), difference between inputs and outputs in the salt balance developed in the irrigated area in the Arba basin for the four study years (2004-2007)

Año		2004	2005	2006	2007	04-07
t/ha·año						
E-ENTRADAS	R	1,46	1,37	1,69	1,43	1,49
	P	0,12	0,05	0,09	0,08	0,08
	RI	0,13	0,03	0,04	0,19	0,10
	AL	0,19	0,01	0,04	0,11	0,09
	AB	0,27	0,05	0,09	0,15	0,14
	RS	0,41	0,18	0,32	0,29	0,30
	EL	0,44	0,00	0,00	0,35	0,20
	AP	0,09	0,11	0,07	0,02	0,07
	DP	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
S-SALI	AT	7,41	5,69	4,78	5,60	5,87
	AC	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
	SB	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
ΣEntradas (t/ha·año)		3,13	1,83	2,36	2,65	2,49
ΣSalidas (t/ha·año)		7,55	5,84	4,92	5,74	6,01
E – S (t/ha·año)		-4,42	-4,01	-2,56	-3,10	-3,52

encima de 1,5 dS/m oscilando entre 7,48 dS/m (09/07/2006) y 0,54 dS/m (03/04/2007).

La mayor entrada (3,13 t/ha) y salida (7,55 t/ha) de sales al sistema se produjo en el año más lluvioso (2004). En cambio, mientras la menor aportación (1,83 t/ha) se registró el año más seco (2005), la menor salida (4,92 t/ha) se presentó al año siguiente (2006) debido al desfase existente entre las entradas y salidas por la propia regulación hídrica del sistema.

La diferencia entre entradas y salidas de sales fue negativa en los cuatro años de estudio (tabla 1) oscilando entre -4,42 t/ha de 2004 y -2,56 t/ha de 2006. Estas diferencias se debieron al resultado de los procesos de disolución/precipitación, a las sales contenidas en el agua almacenada cada año en el sistema y a los errores del balance.

Teniendo en cuenta que al final de los cuatro años de estudio el desbalance hídrico fue prác-

ticamente nulo (Causapé *et al.*, 2009), la diferencia entre entradas y salidas durante el periodo de estudio (3,52 t/ha-año) pudo asociarse principalmente al predominio de los procesos de disolución de sales sobre los de precipitación.

Del total de sales exportadas (AT+AC+SB), el 85% (5,09 t/ha-año) fueron asociadas al drenaje propio del sistema evaluado. Anualmente, el lluvioso año 2004 registró el mayor D_s (6,00 t/ha) a consecuencia de la mayor cantidad de sales disueltas (4,42 t/ha), mientras que 2006 (año posterior a la sequía de 2005), presentó el menor D_s (4,35 t/ha) a pesar de que las sales introducidas con el riego (1,69 t/ha) fueron las mayores de los cuatro años de estudio.

La evolución mensual de D_s (fig. 1) reflejó cómo partiendo de valores en torno a 0,4 t/ha-mes, las intensas lluvias de septiem-

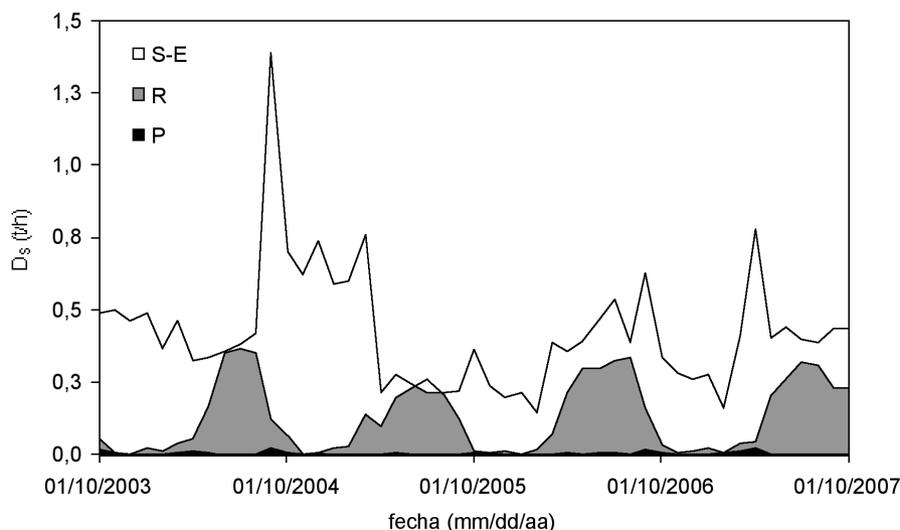


Figura 1. Evolución mensual de las sales exportadas en el drenaje propio del sistema evaluado (D_s) y la contribución a éste de las sales introducidas con la precipitación (P), riego (R), y disolución de materiales geológicos (S-E).

Figure 1. Monthly evolution of the salt mass exported by the drainage associated to the evaluated system (D_s) and the contribution of salt inputs towards precipitation (P), irrigation (R), and dissolution of geological materials (S-E).

bre de 2004 provocaron un máximo mensual de 1,4 t/ha·mes manteniéndose en valores elevados (en torno a 0,7 t/ha·mes) hasta la campaña de riego de 2005. Entonces, la ausencia de lluvias mermó las dotaciones de riego aplicadas maximizando el aprovechamiento de agua (Causapé *et al.*, 2009) y minimizando la masa de sales exportada (en torno a 0,3 t/ha·mes). Salvo algunos picos producidos por el drenaje de lluvias, los años hidrológicos 2005 y 2006 se comportaron de forma similar alcanzando valores mínimos al final del invierno (en torno a 0,3 t/ha·mes) y máximos en plena campaña de riego (en torno a 0,5 t/ha·mes).

Un 69% de D_s procedió de la disolución de los materiales geológicos (3,52 t/ha·año), otro 29% tuvo su origen en las sales introducidas con el agua de riego (1,49 t/ha·año) y tan solo el 2% se correspondieron a las sales contenidas en el agua de lluvia (0,08 t/ha·año).

La salinidad del drenaje propio del regadío evaluado (4,8 dS/m) fue más del doble de la medida en AT (2,2 dS/m) mostrando que los componentes no asociados al regadío que confluyeron en el río (RI, AL, AB, RS, EL, AP, y DP) tuvieron un carácter diluidor.

Atendiendo a una CE_{NR} del regadío evaluado de 3 dS/m (CE media de las muestras de AT tomadas en temporada de no riego), el ICS de 2004 fue de 2 t/ha/dS/m (fig. 2). El ICS disminuyó en 2005 y 2006 que con la menor masa de sales exportada presentó el menor ICS (1,45 t/ha/dS/m).

La evolución anual del ICS acumulado (fig. 2), donde el desfase entre entradas y salidas cada vez toma menos importancia, indicó que desde 2004 existió una disminución del 15% en el ICS acumulado, si bien, el ICS anual de 2007 registró un ligero aumento de 0,08 t/ha/dS/m sobre el de 2006.

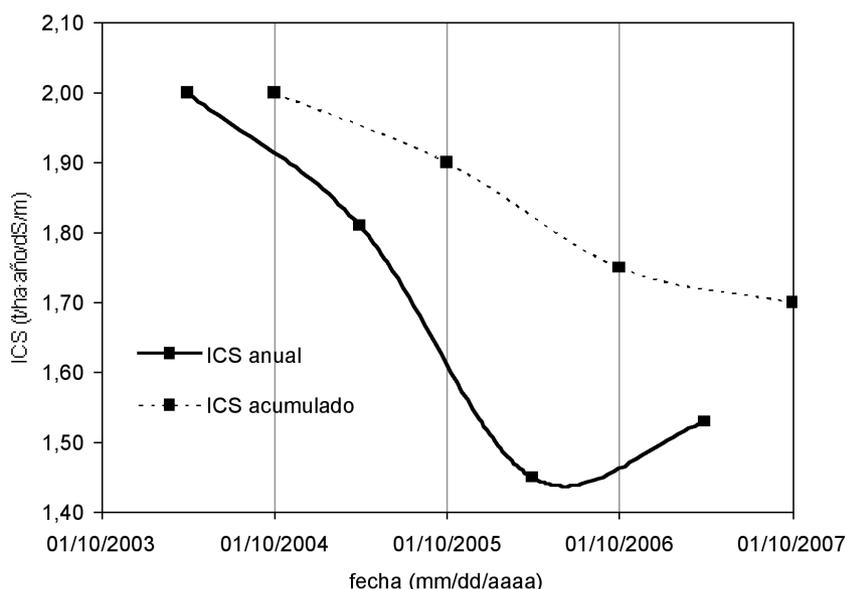


Figura 2. Índice de Contaminación por Sales (ICS) del área regable incluida en la cuenca del Arba en los cuatro años de estudio (2004-2007) y anualmente acumulado.

Figure 2. Salt Contamination Index (ICS) in the irrigated area belonging to the Arba basin, for the four study years (2004-2007) and the yearly accumulated.

La masa de sales exportada por el drenaje de Bardenas (5 t/ha-año) fue ligeramente superior a la cuantificada en pequeñas cuencas menos salinas de este mismo sistema de riegos, lo que se tradujo en un ICS un 65% inferior (tabla 2). Este hecho se debió principalmente a la intensa reutilización del agua de drenaje para el riego, que incrementó un 31% el aprovechamiento de agua en el sistema disminuyendo a su vez la masa de sales exportada. De hecho, otros regadíos de Monegros I con menor salinidad pero inferior aprovechamiento del agua exportaron cuatro veces más de sales y presentaron un ICS siete veces superior (tabla 2).

El ICS del área de estudio (1,7 t/ha-año/dS/m) fue del mismo orden al obtenido en modernos regadíos de Monegros II (1,6 t/ha-año/dS/m), si bien, la masa de sales exportada por estos últimos fue casi tres veces superior porque la cantidad de sales de sus materiales geológicos es casi el triple.

La masa de sales exportada por el área regable de Bardenas incluida en el Arba fue entre 3 y 15 veces superior a subcuencas del Arba en condiciones de secano con más sales

(Cuenca del Barranco de Lerma: $CE_{NR} = 3,79$ dS/m; Abrahão *et al.*, 2008) o menos sales (Cuenca del Arba de Luesia: AL: $CE_{NR} = 0,57$ dS/m), arrojando ICS tres veces superiores. No obstante, el escaso margen de incremento del Índice de Aprovechamiento del Agua (IAA; Causapé *et al.*, 2009) indica que escasamente se podrá reducir las sales exportadas de Bardenas, hasta que con el paso del tiempo se vayan lavando del suelo y subsuelo.

Nitrato

A pesar de sus bajas concentraciones (2 mg NO_3^-/l), dos tercios de las entradas consideradas en el balance de nitrato estuvieron asociadas al agua de lluvia (34%) y del riego (32%). El nitrato procedente de las áreas exteriores de secano (RI, AL, AB, RS) constituyó un 27% a las entradas del balance siendo muy inferior los aportes por EL (4%), AP (2%) y DP (1%).

Las salidas se produjeron básicamente a través de AT (96%) justificando el menor esfuerzo invertido en la estimación de AC (2%) y SB (2%). La $[NO_3^-]$ media de las mues-

Tabla 2. Índice de Aprovechamiento de Agua (IAA), Conductividad Eléctrica del drenaje en época de no riego (CE_{NR}), Masa anual de sales exportada en el drenaje (D_s) e Índice de Contaminación por Sales (ICS) para el área regable incluida en la cuenca del Arba (Arba-Bardenas) y para los regadíos estudiados en Bardenas I (Lasanta *et al.*, 2002; Causapé *et al.*, 2004), Monegros I (Isidoro *et al.*, 2006a-b) y Monegros II (Tedeschi *et al.*, 2001; Cavero *et al.*, 2003)

Table 2. Water Use Index (IAA), Electrical Conductivity of the drainage during non-irrigation season (CE_{NR}), yearly salt mass exported by the drainage (D_s) and Salt Contamination Index (ICS) for the irrigated area belonging to the Arba basin (Arba-Bardenas) and for the irrigated lands studied in Bardenas I (Lasanta *et al.*, 2002; Causapé *et al.*, 2004), Monegros I (Isidoro *et al.*, 2006a-b) and Monegros II (Tedeschi *et al.*, 2001; Cavero *et al.*, 2003)

	IAA %	CE_{NR} dS/m	D_s t/ha-año	ICS t/ha-año/dS/m
Arba-Bardenas	83	3,00	5	1,7
Bardenas I	52	0,85	4	4,8
Monegros I	48	1,78	20	11,4
Monegros II	90	8,40	14	1,6

tras colectadas en AT fue de 40 mg/l (CV= 35%), si bien, una vez ponderada por volumen, la [NO₃⁻] media fue inferior (33 mg/l). Un 25% de las muestras colectadas presentó concentraciones superiores al límite sanitario de 50 mg/l existiendo concentraciones máximas de 94 mg/l (18/11/2004) y mínimas de 1 mg/l (10/09/2005).

Los flujos hídricos no asociados al regadío evaluado (RI, AL, AB, RS, EL, AP, y DP), que supusieron respectivamente el 29 y 18% del agua y sales en AT, AC y SB, tan sólo supusieron el 9% del nitrato saliente demostrando

que la mayor parte de nitrato exportado de la cuenca del Arba tuvo su origen en el regadío.

La diferencia entre las entradas y salidas (tabla 3) se justificó como el resultado de los componentes del balance no tenidos en cuenta (fertilización nitrogenada, volatilización, extracción en las cosechas...) y el nitrato acumulado en el sistema, bien en acuíferos o en el suelo.

En los cuatro años de estudio, las entradas menos las salidas fueron negativas, oscilando entre -29 kg N-NO₃⁻/ha del lluvioso año

Tabla 3. Entradas (R-Riego, P-Precipitación, RI-Riguel, AL-Arba de Luesia, AB-Arba de Biel, RS-Resto Secano, EL-agua destinada a generar electricidad y posteriormente vertida al Arba sin uso para riego, AP-Abastecimiento a pequeñas poblaciones, y DP-Depuradora de Ejea), Salidas (AT-Arba en Tauste, AC-Acequias laterales que puentean la estación del Arba en Tauste, SB-flujo subterráneo a través del aluvial del Arba), diferencia entre entradas y salidas (E-S) del balance de nitrato desarrollado en el área regable incluida en la cuenca del Arba para los cuatro años de estudio (2004-2007).

Table 3. Inputs (R-Irrigation, P-Precipitation, RI-Riguel, AL-Arba de Luesia, AB-Arba de Biel, RS-Rainfed land, EL- Water used to generate electricity and then disposed into the Arba without being used for irrigation, AP-Water supply to small villages, DP- Sewage treatment plant of Ejea), Outputs (AT-Arba Tauste, AC-Lateral channel in Arba Tauste, SB-Groundwater flow through Arba aquifer), difference between inputs and outputs in the nitrate balance developed in the irrigated area in the Arba basin for the four study years (2004-2007).

Año		2004	2005	2006	2007	04-07
t/ha·año						
E-ENTRADAS	R	2,4	2,2	2,8	2,3	2,4
	P	3,6	1,4	2,8	2,4	2,6
	RI	0,4	0,1	0,2	0,7	0,3
	AL	0,7	0,0	0,1	0,4	0,3
	AB	0,8	0,2	0,2	0,5	0,4
	RS	1,5	0,5	0,9	1,0	1,0
	EL	0,7	0,0	0,0	0,6	0,3
	AP	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1
	DP	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
S-SALI	AT	37,7	28,4	18,7	26,2	27,7
	AC	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	SB	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
ΣEntradas (kg N-NO ₃ ⁻ /ha·año)		10	5	7	8	8
ΣSalidas (kg N-NO ₃ ⁻ /ha·año)		39	29	20	27	29
E-S (kg N-NO ₃ ⁻ /ha·año)		-29	-25	-12	-19	-21

2004, que presentó las mayores entradas y salidas (10 y 39 kg N-NO₃⁻/ha), y -12 kg N-NO₃⁻/ha de 2006, que presentó las menores salidas (20 kg N-NO₃⁻/ha) con posterioridad al año con menores entradas (2005: 5 kg N-NO₃⁻/ha).

Dado que al final de los cuatro años de estudio el balance hídrico cerró adecuadamente, los 29 kg N-NO₃⁻/ha·año salientes de la cuenca del Arba se justificaron con el nitrato aportado en el riego y la lluvia (5 kg N-NO₃⁻/ha·año), el nitrato entrante no asociado al regadío estudiado (3 kg N-NO₃⁻/ha·año) y 21 kg N-NO₃⁻/ha·año más (72% de las salidas) asociados a otros aportes de nitrato, principalmente, con la fertilización de los cultivos y otros componentes del balance de nitrógeno no considerados.

Las NF media de los cuatro años de estudio fue de 90 kg N/ha·año con pequeña variabilidad anual (CV= 5%). La menor superficie de maíz en 2004 propició un descenso de 6 y 4 kg N/ha·año en las NF de 2005 (85 kg N/ha·año) y 2006 (87 kg N/ha·año). La pequeña recuperación de la superficie cultivada de maíz unido al incremento del cereal de invierno, principalmente por alfalfa, condicionó la máxima NF de 2007 (95 kg N/ha).

Las variaciones anuales en las NF se manifestaron en el drenaje medido al final de la cuenca con varios meses de retraso, ya que el nitrógeno aportado con los fertilizantes se vio condicionado en su lixiviado del suelo a la disponibilidad en forma de nitrato. Además, el drenaje de la cuenca estuvo afectado por la regulación hídrica del sistema.

Aún así, las reducciones de NF en 2005 y 2006 se hicieron notar en su drenaje anual al presentar un 20 y 49% menos de nitrato exportado que en 2004, con concentraciones del drenaje un 32 y 43% inferiores (tabla 4). El ascenso de las necesidades de fertilización y el drenaje asociado al regadío evaluado en 2007 incrementó D_N de 18 a 24 kg N-NO₃⁻/ha pero no así la concentración del drenaje que presentó el mínimo anual de 59 mg/l.

El ICN anual osciló entre 0,38 de 2004 y 0,21 de 2006, presentando una alta variabilidad (CV= 26%) que confirma la necesidad de realizar este tipo de estudios con carácter plurianual.

Analizando la evolución anualmente acumulada de D_N, NF, e ICN (fig. 3) se observó que hasta finales de 2006 D_N disminuyó 4 kg N-

Tabla 4. Necesidades de Fertilización (NF), Drenaje propio del sistema (D), masa (D_N) y concentración de nitrato ([NO₃⁻]_D) de éste e Índice de Contaminación por Nitratos (ICN) para el área regable de Bardenas incluida en la cuenca del Arba en los cuatro años del estudio (2004-2007).

Table 4. Fertilization needs (NF), Drainage associated to the drainage (D), exported nitrate mass (D_N) and nitrate concentration ([NO₃⁻]_D) of the system, and Nitrate Contamination Index (ICN) for the irrigated area belonging to the Arba basin for the four study years (2004-2007).

Año	2004	2005	2006	2007	04-07
NF (kg N/ha·año)	91	85	87	95	90
D (mm·año)	135	160	122	180	149
D _N (kg N-NO ₃ ⁻ /ha·año)	35	28	18	24	26
[NO ₃ ⁻] _D (mg/l)	114	78	65	59	78
ICN	0,38	0,33	0,21	0,25	0,29

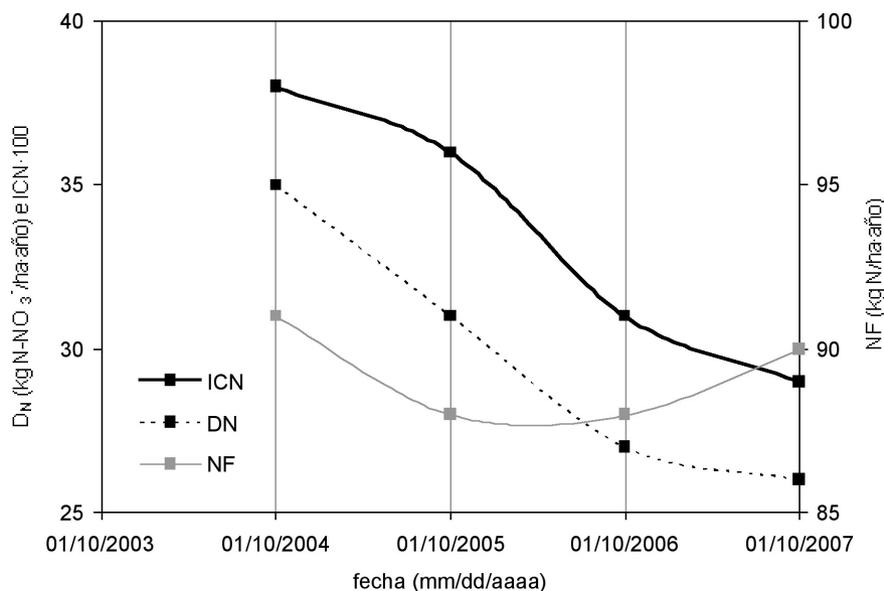


Figura 3. Masa de nitrato exportada en el drenaje propio del sistema (D_N), Necesidades de Fertilización (NF) e Índice de Contaminación por Nitratos (ICN) anualmente acumulados para los cuatro años de estudio (2004-2007) en el área regable incluida dentro de la cuenca del Arba.
 Figure 3. Nitrate mass exported by the drainage associated to the system (D_N), yearly cumulative Fertilization Needs (NF) and Nitrate Contamination Index (ICN), for the four study years (2004-2007) in the irrigated area belonging to the Arba basin.

$\text{NO}_3^-/\text{ha}\cdot\text{año}$ reduciéndose 1 $\text{kg N-NO}_3^-/\text{ha}$ más hasta finales de 2007 cuando se obtuvo la media de 26 $\text{kg N-NO}_3^-/\text{ha}\cdot\text{año}$ en los cuatro años de estudio. La menor disminución de D_N en 2007 estuvo condicionada por el incremento en este último año de las NF y D (tabla 4).

Con todo ello, el ICN presentó durante los años de estudio una clara tendencia descendente desde 0,38 en 2004 a 0,29 al final del periodo de estudio. Ello indicó una mejora continuada en el aprovechamiento del nitrógeno aplicado a los cultivos con la fertilización traducida en el descenso de la concentración y masa de nitrato exportado en el drenaje.

Comparando los resultados obtenidos en este estudio (tabla 5) frente a los obtenidos en

otras pequeñas cuencas de regadíos del Ebro se pudo observar que el D_N de los regadíos incluidos en la cuenca del Arba (26 $\text{kg N-NO}_3^-/\text{ha}\cdot\text{año}$) fue la cuarta parte de lo que exportaron pequeñas subcuencas de su mismo sistema de Bardenas (108 $\text{kg N-NO}_3^-/\text{ha}\cdot\text{año}$) y de otros sistemas como Monegros I (111 $\text{kg N-NO}_3^-/\text{ha}\cdot\text{año}$) también regados por inundación sobre suelos inadecuados para ello.

Este hecho estuvo condicionado a que NF fue un 40% inferior pero también a que el índice de aprovechamiento del agua fue en torno a un 30% superior. Así pues, la intensa reutilización del agua de drenaje que se hizo en Bardenas actuó doblemente, ya que los cultivos reaprovecharon tanto parte del agua como del nitrato contenido en el drenaje.

Tabla 5. Índice de Aprovechamiento de Agua (IAA), Necesidades de Fertilización (NF), Masa anual de nitrato exportado en el drenaje (D_N) e Índice de Contaminación por Nitrato (ICN) para el área regable incluida en la cuenca del Arba (Arba-Bardenas) y para los regadíos estudiados en Bardenas I (Causapé et al., 2004b-c), Monegros I (Isidoro et al., 2006a-b) y Monegros II (Cavero et al., 2003)

Table 5. Water Use Index (IAA), Fertilization needs (NF), yearly salt mass exported by the drainage (D_N) and nitrate Contamination Index (ICN) for the irrigated area belonging to the Arba basin (Arba-Bardenas) and for the irrigated lands studied in Bardenas I (Causapé et al., 2004), Monegros I (Isidoro et al., 2006a-b) and Monegros II (Cavero et al., 2003)

	IAA %	NF Kg N/ha·año	D_N Kg N-NO ₃ ⁻ /ha·año	ICN
Arba-Bardenas	83	90	26	0,29
Bardenas I	52	146	108	0,74
Monegros I	48	155	111	0,71
Monegros II	90	145	31	0,22

Las menores NF de los regadíos de Bardenas incluidos en la cuenca del Arba (90 kg N/ha·año) frente a las NF de los modernos regadíos por aspersión de Monegros II (145 kg N/ha·año) también condicionaron que la masa de nitrato exportada fuese un 16% inferior, si bien, el ICN fue un 24% superior.

Ello indica que el aprovechamiento del nitrógeno aportado para la fertilización de los cultivos en Bardenas debería ser mejorado en parcela mediante un adecuado manejo combinado del riego y fertilización nitrogenada, algo que no es fácil de conseguir en Bardenas por la presencia mayoritaria de suelos muy permeables de baja capacidad de retención de agua y sistemas de riego por inundación que no permiten un control suficiente de las fechas-dosis de agua y nitrógeno a aplicar.

No obstante, cambios en la gestión del riego por inundación, de turnos a la demanda, o la facturación por consumo de agua en vez de por superficie regada son medidas baratas que han reducido a la mitad el agua, sales y nitrato exportados en una pequeña cuenca de la CR_V de Bardenas (Causapé y Clavería, 2007).

La tendencia positiva de los últimos años también indica que sin importantes cambios del regadío sigue habiendo margen de mejora en la aplicación de fertilizantes nitrogenados, algo que no sólo es conveniente para el medioambiente, sino también para el sector agrario por el alto coste que están alcanzando los agroquímicos en los últimos años.

Conclusiones

A pesar de su baja mineralización (275 mg/l), el 60% de las sales introducidas en el sistema evaluado lo hicieron a través del agua de riego. En cuanto a las salidas, el 98% se produjeron a través de AT. Del total de sales exportadas (AT+AC+SB), el 85% (5,09 t/ha·año) fueron asociadas al drenaje propio del sistema evaluado. De éstas, un 69% procedió de la disolución de materiales geológicos (3,52 t/ha·año), otro 29% tuvo su origen en las sales introducidas con el agua de riego (1,49 t/ha·año) y tan solo el 2% se correspondieron a las sales contenidas en el agua de lluvia (0,08 t/ha·año).

Los flujos hídricos no asociados al regadío evaluado (RI, AL, AB, RS, EL, AP, y DP), que supusieron respectivamente el 29 y 18% del agua y sales en AT, AC y SB, tan solo supusieron el 9% del nitrato saliente demostrando que la mayor parte de nitrato exportado tuvo su origen en el regadío.

La masa de sales exportada fue máxima en el lluvioso año 2004 (6,00 t/ha), para descender en 2005 (5,42 t/ha) y 2006 (4,35 t/ha) a causa de la sequía e incrementarse ligeramente en 2007 (4,60 t/ha). Las reducciones de NF en 2005 (85 kg N/ha) y 2006 (87 kg N/ha) también contribuyeron a una disminución del 20% (28 kg N-NO₃⁻/ha) y 49% (18 kg N-NO₃⁻/ha) del nitrato exportado en 2004 (NF: 91 kg N/ha, DN: 35 kg N-NO₃⁻/ha) mientras que el ascenso de NF en 2007 (95 kg N/ha) contribuyó al incremento de su D_N a 24 kg N-NO₃⁻/ha.

La reducción de ICS (15%) e ICN (23%) indica que entre 2004 y 2007 ha existido una disminución del impacto agroambiental inducido por los regadíos de Bardenas. La intensa reutilización del agua de drenaje que se practicó (Causapé *et al.*, 2009), provocó que estos índices fuesen 60% inferiores a los obtenidos en pequeñas cuencas del mismo regadío. No obstante, el ICN todavía es un 24% superior al obtenido en modernos regadíos, indicando la necesidad de adecuar el manejo combinado del riego y fertilización en parcela, algo difícil de conseguir en Bardenas por su mayoritario riego por inundación en relación a la alta permeabilidad de los suelos.

Listado de abreviaturas

AB: Sales/nitratos introducidos a través del Arba de Biel

AC: Sales/nitratos exportados a través de dos acequias que puentean la estación de aforos del AT.

AL: Sales/nitratos introducidos a través del Arba de Luesia

AP: Sales/nitratos introducidos con el abastecimiento pequeñas poblaciones

AT: Sales/nitratos exportados a través del Arba en Tauste

CE: Conductividad eléctrica a 25°

CE_{NR}: Conductividad eléctrica a 25° media del drenaje en periodo de no riego

CV: Coeficiente de variación

D_{S-N}: Sales/nitratos exportadas a través del drenaje asociado al regadío estudiado

DP: Sales/nitratos introducidos por la depuradora de Ejea

E: Entradas a los balances de masas

EL: Sales/nitratos introducidos con el agua destinada a generar electricidad sin uso para riego

EMEP: European Monitoring and Evaluation Program

EMR: Evaluador Medioambiental de Regadíos

EPA: Environmental Protection Agency

EU: European Union

FAO: Food and Agricultura Organization of the United Nations

[HCO₃⁻]: Concentración de bicarbonato

IAA: Índice de Aprovechamiento de Agua

ICN: Índice de Contaminación por Nitratos

ICS: Índice de Contaminación Salina

NF: Necesidades de Fertilización

[NO₃⁻]: Concentración de nitrato

P: Sales/nitratos introducidos con la precipitación

OMS: Organización Mundial de la Salud

R: Sales/nitratos introducidos con el riego

RI: Sales/nitratos introducidos a través del Riguel

RS: Sales/nitratos procedentes del resto de secano (superficie no regable)

S: Salidas de los balances de masas

SB: Sales/nitratos exportados subterráneamente a través del aluvial del Arba en Tauste

SDT: Sólidos disueltos totales

Agradecimientos

Agradecer a Confederación Hidrográfica del Ebro la financiación del estudio.

Referencias

- Abrahão R, Clavería I, Causapé J, García I, 2008. La transformación en riego del sector XII de Bardenas II (Zaragoza). Impacto ambiental en su segundo año bajo riego. Actas del XXVI Congreso Nacional de Riegos de Huesca. 59-60.
- Betrán J, 2006. Revisión de la fertilización nitrogenada. Fertilización nitrogenada. Guía de actualización. Informaciones Técnicas. Centro de Investigación y Tecnología agroalimentaria. Ed. Gobierno de Aragón. 196 pp.
- Bower C, Wilcox L, 1965. Soluble salt. In: Methods of soil analysis. Chemical and Microbiological Agronomy nº 9. American society of agronomy. Part 2. 933-951 pp.
- Causapé J, Quílez D, Aragüés R, 2004. Assessment of irrigation and environmental quality at the hydrological basin level. II: salt and nitrate loads in irrigation return flows. Agricultural Water Management. 70: 211-218.
- Causapé J, Quílez D, Aragüés R, 2006. Irrigation efficiency and quality of irrigation return flows in the Ebro River Basin: An overview. Environmental Monitoring and Assessment. 117: 451-461.
- Causapé J, Clavería I, 2007. Drought as an agri-environmental determinant of irrigation land. The case of Bardenas (Spain). Environmental Geology. 51(7): 1213-1220.
- Causapé J, 2008. EMR 1.0: Herramienta al servicio de la vigilancia agroambiental del regadío. Información Técnica Económica Agraria. 104(3): 369-380.
- Causapé J, García-Garizábal I, Abrahão R, 2009. Aprovechamiento del agua en los regadíos de Bardenas. Información Técnica Económica Agraria. poner volumen y páginas cuando estén asignadas.
- Cavero J, Beltrán A, Aragüés R, 2003. Nitrate exported in the drainage water of two sprinkler irrigated watershed. J. Environmental Quality 32: 916-926.
- Custodio E, Llamas M.1983. Hidrología Subterránea. Ediciones Omega. 2.290 pp.
- EMEP, 2008. European Monitoring and Evaluation Program. Análisis de agua de lluvia disponibles en: <http://www.nilu.no/projects/ccf/>
- European Union, 1998. Council Directive 98/83/CE of 3 November 1998 imposed to the surface waters devoted to the production of water for human consumption. Official Journal L 330, 5/12/1998. 32-54.
- FAO, 2002. Agua y cultivos. Logrando el uso óptimo del agua en la agricultura. Depósito de documentos de la FAO. 22 pp.
- Isidoro D, Quílez D, Aragüés R, 2006a. Environmental Impact of Irrigation in La Violada District (Spain): I. Salt Export Patterns. Journal Environmental Quality 35: 766-775.
- Isidoro D, Quílez D, Aragüés R, 2006b. Environmental Impact of Irrigation in La Violada District (Spain): II. Nitrogen Fertilization and Nitrate Export Patterns in Drainage Water. Journal Environmental Quality 35: 776-785.
- Jiménez R, Lamo de Espinosa J, 1998. Agricultura sostenible. Mundiprensa Madrid. 616 pp.
- Lasanta T, Mosch W, Pérez-Rontomé MC, Navas A, Machín J, Maestro M, 2002. Effects of irriga-

- tion on water salinization in semi-arid environments. a case study in Las Bardenas, Central Ebro Depression, Spain. Environmental change and water sustainability. García-Ruíz J.M., Jones A., Arnáez J. Eds. Instituto Pirenaico de Ecología. 198-218.
- OMS, 2004. Guías para la calidad del agua potable. Volumen 1. Recomendaciones. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 2004.
- Orús F, Sin E, 2006. El balance del nitrógeno en la agricultura. Capítulo 1 en Fertilización Nitrogenada. Guía de actualización. Informaciones Técnicas. Centro de Transferencia Agroalimentaria. Ed. Gobierno de Aragón. 196 pp.
- Scavia D, Bricker S, 2006. Coastal eutrophication assessment in the United States. Biogeochemistry 79(1-2): 187-208.
- Tedeschi A, Beltrán A, Aragüés R, 2001. Irrigation management and Hydrosalinity balance in a semi-arid area of the middle Ebro River Basin (Spain). Agricultural Water Management. 49: 31-50.
- Wang B, 2006. Cultural eutrophication in the Changjiang (Yangtze River) plume: History and perspective. Estuarine Coastal and Shelf Science. 69(3-4): 471-477.
- (Aceptado para publicación el 9 de junio de 2009)

Identificación del inicio de la ecodormancia en cerezo variedad "Bing"

E. Tersoglio, G. Naranjo

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, Dirección San Martín 3.853 Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina. CC3 CP 5507. E-mail: etersoglio@mendoza.inta.gov.ar

Resumen

La endodormancia es la incapacidad de la planta de iniciar la brotación aún con temperaturas favorables. Mientras que en la ecodormancia la falta de brotación es experimentada sólo cuando las temperaturas son desfavorables para el crecimiento. Tanto el frío, como el calor tienen efecto acumulativo y se miden en unidades de frío Utah modificado (UFUM) y en unidades de calor, Horas Grados Centígrados de Crecimiento (GDH°C). Establecer la entrada en ecodormancia permite determinar los requerimientos de GDH°C. El estudio se realizó en dos localidades diferentes durante tres años y tiene como objetivo establecer las necesidades de frío de la endodormancia y los requerimientos de frío y de calor de la ecodormancia. Se observó que con más de 677 UFUM las yemas de la variedad 'Bing' brotan con cantidades medias de calor. El efecto de las unidades de calor y de frío sobre la brotación sigue la ley de Arrhenius. El modelo doble exponencial seleccionado explica convenientemente el efecto interacción frío-calor sobre la brotación. Además permite determinar con mayor certeza el límite, a partir del cual, los tejidos son sensibles a los productos reemplazantes de frío, permitiendo evaluar sus efectos con una base eco-fisiológica más sólida.

Palabras clave: Endodormancia, Ecodormancia, Requerimientos de Frío, Requerimientos de Calor, Cerezo.

Summary

Identification of the beginning of the ecodormancy in "Bing" sweet cherry variety

The endodormancy is the tree inability to restart budbreak even with moderate temperatures. Meanwhile in the ecodormancy the lack of budbreak is observed only when temperatures are not favorable for growing. Both, the chill and the heat, have cumulative effect. They are measured in modified Utah Chill Units (UFUM) and Growing Degree Centigrade Hours (GDH°C) respectively. The ecodormancy beginning allows setting up the GDH°C requirements. This study was carried out in two locations and during three years. The objective was: to determine the endodormancy chilling requirements and ecodormancy chilling and heat necessities. It was observed that with more than 677 UFUM the buds of "Bing" variety were sensitive to middle amount of heat. The UFUM and GDH°C effect on budbreak follows the Arrhenius law. The double exponential mathematical model selected explains conveniently the heat-cold effect on budbreak. It also allows determining when vegetative tissue begins to be sensitive to chemical products that replaces chill unit and allow assessing their effects with a more solid ecophysiological base.

Key words: Endodormancy, Ecodormancy, Chill Requirement, Heat Requirement, Sweet Cherry.

Introducción

Según Lang *et al.* (1987) la dormición es una suspensión temporal del crecimiento visible de las estructuras de la planta que poseen meristemas. En consecuencia queda determinado que tanto el crecimiento como el desarrollo se reduce o detiene y que además es posible reiniciar la actividad meristemática. En la dormición se diferencian tres etapas. La paradormancia que no necesita frío y se inicia durante la estación de crecimiento. La endodormancia que se inicia después de la abscisión de las hojas y sólo es superada por la exposición a bajas temperaturas se caracteriza por la ausencia de brotación, aún con suficiente acumulación de calor. La ecodormancia se inicia una vez cumplida parte de las necesidades de frío y comienza el efecto de interacción frío-calor sobre la brotación. Las yemas adquieren gradualmente la capacidad de reasumir el crecimiento a medida que reciben cierta cantidad de calor y captando, simultáneamente, el estímulo del frío (Richardson *et al.*, 1974; Couvillon y Erez, 1985; Couvillon, 1995; Faust *et al.*, 1995; Faust *et al.*, 1997; Egea *et al.*, 2003; Tersoglio *et al.*, 2006).

El frío por sí mismo, no provoca brotación, sino que sólo "sensibiliza" los tejidos permitiendo captar el calor.

Fishman *et al.* (1987a y b), elaboraron un modelo experimental, con el objeto de explicar el proceso de cumplimiento de los requerimientos de frío. El mismo se fundamenta en que la velocidad de formación de los inhibidores de la dormancia dependen exponencialmente de la temperatura y que este proceso sigue la ley de "Arrhenius". Además establecieron que un incremento de la temperatura por encima de un máximo provoca la reversibilidad del proceso. El sistema establece que la unidad de medición se denomina "porción de frío" (PF) (Fishman *et al.*, 1987a y b; Erez *et al.*, 1990; Erez y Fishman, 1998).

Existe cierta similitud entre la metodología del cálculo de las PF y el de las unidades de frío (UF) ya que ambas consideran que el fenómeno puede ser revertido por el calor (Fishman *et al.*, 1987a y b; Seedley, 1996; UC Fruit & Nut Reserch Information Center, 2006).

El calor también tiene efecto acumulativo y se mide en unidades de calor (GDH°C). Estas se definen como la sumatoria de las temperaturas horarias entre 4,5°C y 25°C. Por encima 36°C no hay acumulación. El método considera que el efecto del calor no es reversible (Richardson *et al.*, 1986).

Generalmente los esfuerzos fueron orientados hacia la determinación del total de los requerimientos de frío. Pero la bibliografía es escasa en información relacionada con los requerimientos de calor de la ecodormancia y menor aún con los requerimientos de frío de la endodormancia. (Couvillon, 1995; Egea *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista de la dormición, las yemas de la planta poseen un grado variable de inhibición y por lo tanto el nivel de dormancia de todo huerto, se estima mediante de la media poblacional. Es por ello que los límites entre ambas fases no son netos, sino progresivos y por lo tanto la identificación del límite entre endodormancia y ecodormancia presenta dificultades (Richardson *et al.*, 1974; Lang *et al.*, 1987; Faust *et al.*, 1997; Citadin *et al.*, 2001; Dennis, 2003).

Desde el punto de vista del frío ambos conceptos, endodormancia y ecodormancia, son complementarios ya que su adición constituye la totalidad del requerimiento, la dormancia. El establecimiento del límite entre ambas etapas afecta directamente la acumulación posterior de los GDH°C. Ello se debe a que un retraso en el inicio de la ecodormancia (inicio de la acumulación de GDH°C) aumenta las UF de la endodormancia y en consecuencia reduce las UF y las GDH°C de la ecodormancia y viceversa (Egea

et al., 2003). El comienzo de la ecodormancia puede ser identificado a través del inicio de la brotación. Pero para que ella se manifieste es necesario una cantidad de calor mínima que debe ser preestablecida.

Existen numerosos trabajos que determinan los requerimientos de toda la dormancia pero son escasos aquellos que los discriminan en endodormancia y ecodormancia (Mielke y Dennis, 1975; Shaltout y Unrath, 1983; Werner et al., 1988; Ramina et al., 1995; Mahmood et al., 2000; Egea et al., 2003; Cortéz y Gratacós, 2008).

El presente trabajo tiene como objetivo establecer las necesidades de frío de la endodormancia y los requerimientos de frío y de calor de la ecodormancia en yemas vegetativas de cerezos de la variedad 'Bing'.

Material y método

Los estudios se realizaron con materiales extraídos de plantas de 12 años de edad de la variedad 'Bing' sobre portainjerto *Prunus mahaleb* L. de dos cultivos ubicados en el departamento Luján de Cuyo, Mendoza en los distritos Carrodilla (33° de LS y 950msnm) y Las Compuertas (33°LS y 1.100msnm). Ambas localidades poseen UFUM y GDH°C diferentes debido a la diferencia de altitud.

Se midió el efecto que producen diferentes cantidades de UFUM y de GDH°C sobre la brotación. Los ensayos se realizaron sobre dos clases de materiales aquellos que recibieron UFUM y GDH°C en condiciones controladas y los de campo. El primero recibió frío de heladera y calor sólo en los túneles de forzado, mientras que el segundo tomó frío y calor, de campo y de invernáculo.

Los materiales expuestos a condiciones controladas fueron estudiados en los años 2006 y 2007 provenientes del departamento de Carro-

dilla. Mientras que los materiales expuestos a condiciones de campo fueron estudiados 2.005-2.006-2.007 procedentes de Carrodilla y Las Compuertas.

Los materiales utilizados fueron ramas agostadas de 1 año de 30-50 cm de longitud. Cumplidas las UFUM, los materiales recibieron los GDH°C en túneles situados en un invernáculo con ventilación forzada y refrigeración evaporativa. Dentro de cada túnel se colocaron pequeñas cámaras envueltas en polietileno de 100 µ de espesor y dentro de ellas los vasos con 100 ml de solución de sacarosa 3%, Carbenzimidazol 1,50 g l⁻¹ a pH 4 con ácido cítrico. En cada uno de los 5 vasos (bloque/repetición), se colocaron 4 brindillas identificadas (unidad experimental), clasificadas por su diámetro basal en menores de 8 mm, entre 8 y 12 mm y mayores de 12 mm. Las mismas fueron pulverizadas periódicamente con Captan 2,50 g l⁻¹.

La temperatura de las cámaras osciló entre 18° y 22°C, la humedad relativa fue del 100% y el fotoperiodo de 16 h con un flujo fotónico fotosintético mínimo de 52 µEm⁻²s⁻² (Faust et al., 1995).

El método utilizado para medir el efecto del frío invernal sobre la brotación es el de unidades de frío Utah modificado (UFUM) por la UC Davis (Seedley, 1996; UC Fruit & Nut Reserch Information Center, 2006; Tersoglio y Naranjo, 2007).

El comienzo de la endodormancia, corresponde al inicio del conteo de UFUM, que se realiza cuando la caída de las hojas alcanzó el 50% (Richardson, 1975; Couvillon, 1995; Ramina et al., 1995; Faust et al., 1997). Durante la ecodormancia el calor fue medido en GDH°C (Richardson et al., 1986).

El inicio de la brotación es considerado cuando el 10% de las yemas alcanzan el estado de punta verde (Baggiolini, 1952; Seif y Gruppe, 1985; Ballard, 1986; Upov, 1995; Vallejo et al., 2002).

En ambos estudios, los tratamientos aplicados fueron combinaciones crecientes de UFUM y de GDH°C.

El análisis de las brotaciones obtenidas de materiales expuestos a condiciones controladas de UFUM y GDH°C permiten calcular las UFUM necesarias para iniciar la ecodormancia con un 10% de brotación. Los materiales fueron expuestos a temperatura constante de 4,5°C. A cada tratamiento primero se aplicó 0; 242; 473; 650; 713; 886; 1.106 y 1.274 UFUM. Luego las brindillas de cada tratamiento recibieron un forzado a una temperatura media de 20°C lo que correspondió a 2.622; 4.156; 5.336 y 7.031 GDH°C. Luego se evaluó la proporción de yemas brotadas en cada tratamiento.

Las brotaciones observadas en los materiales expuestos a condiciones ambientales de campo permitieron calcular la relación UFUM-GDH°C-% brotación en condiciones naturales, posibilitando la validación del mismo. Para ello, en ambas localidades y en los años 2.005-2.006-2.007, se evaluó el porcentaje de brotación de brindillas que fueron expuestas entre 0 a 1.450 UFUM y entre 432 y 14.259 GDH°C.

El diseño experimental utilizado fue el de bloque completamente aleatorizados. La prueba de comparación múltiple de medias utilizada fue Tukey. Los datos fueron analizados y graficados mediante Infostat, TableCurve 3D.

Resultados

Modelo matemático UFUM-GDH°C-% obtenido con materiales expuestos a condiciones controladas

Luego de superado el umbral de frío, se observó un incremento en la brotación debido tanto al aumento de UFUM como al

de GDH°C (interacción frío-calor). La tabla 1 y la figura 1 muestran que las aplicaciones iniciales entre 0 y 650 UFUM no indujeron brotación con la aplicación de 5.336 GDH°C. Sin embargo, luego de recibir la misma cantidad de calor, pero con 713 UFUM, hubo inicio de actividad meristemática. A partir de las 713 UFUM se observa la misma brotación, con mayor UFUM pero con menor requerimiento de calor. Cuando el frío recibido se acercó al máximo, a igual cantidad de calor, la brotación fue cercana al 90%.

La tabla 1 indica que en algún punto, situado entre los 650 y 713 UFUM las yemas comienzan a adquirir capacidad de brotar y se inicia la interacción frío-calor.

La tabla 1 y figura 1 mostraron que aún con elevadas cantidades de frío, 1.106 a 1.274 UFUM, pero con poco calor, 2.622 GDH°C, las yemas no brotaron. Ello indica que también existe un valor mínimo o "umbral de calor" a partir del cual es posible observar brotación. En tal sentido la tabla 1 indica que con 713 UFUM, se inicia la brotación cuando los GDH°C recibidos oscilan entre 4.156 y 5.330.

De modo tal que el inicio de la brotación estará dado por los umbrales térmicos de frío y de calor, en algún punto de la relación UFUM-GDH°C cuyos límites serán 650-713 y 4.156-5.330 para las unidades de frío y de calor respectivamente (Erez *et al.*, 1971; Werner *et al.*, 1988; Tersoglio *et al.*, 2006).

Para estimar las cantidades de UFUM y de GDH°C necesarias para producir inicio de brotación, los datos observados se ajustaron, mediante regresión a un modelo matemático doble exponencial cuyo plano de respuesta muestra las brotaciones medias estimadas para las posibles combinaciones estudiadas de frío y de calor.

Tabla 1. Efecto interacción UFUM-GDH°C-% brotación en yemas expuestas a condiciones controladas, variedad "Bing"
 Table 1. Effect of UFUM-GDH°C-% budbreak on buds exposed to controlled condition, cherry "Bing" cultivar

UFUM	Unidad	GDH°C	Brotación (%)
0			0
242			0
473			0
650			0,71
713			15,55
886			23,89
1.106			78,36
1.274			87,8
		2.622	2,76
		4.156	12,99
		5.336	30,48
		7.031	76,5
0		7.031	0 a
242		5.336	0 a
242		7.031	0 a
473		4.156	0 a
473		5.336	0 a
473		7.031	0 a
650		4.156	0,71 a
650		5.336	0,71 a
713		2.622	0 a
713		4.156	1,1 a
886		2.622	4,44 a
886		4.156	9,17 a
1.106		2.622	2,08 a
1.274		2.622	2,82 a
713		5.336	20,82 b
1.106		4.156	24,27 bc
886		5.336	32,8 bc
713		7.031	40,28 cd
1.274		4.156	46,52 d
886		7.031	74,4 d
1.106		5.336	79,72 e
1.274		5.336	88,61 e

Valores dentro de la columna seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos a nivel de $P \leq 0,05$.

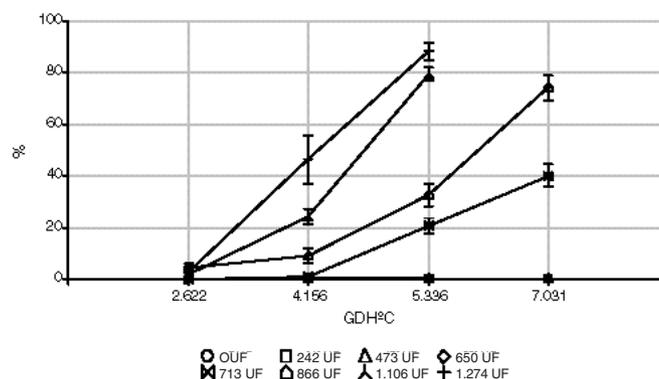


Figura 1. Porcentaje de brotación según UFUM y GDH°C en yemas expuestas a condiciones controladas, variedad "Bing".
 Figure 1. Budbreak percentage according to UFUM and GDH°C on buds exposed to controlled condition "Bing" variety.

La tabla 2 muestra el modelo y los correspondientes estadígrafos de bondad de ajuste, indicando que siguen la Ley de Arrhenius. El modelo seleccionado muestra interacción, ya que se trata del producto de exponenciales que consideran la acumulación de los efectos ponderados del frío y del calor. También el modelo indica que existe aditividad, ya su resultado es un producto de –ambas exponenciales– que poseen la misma base y por lo tanto sus exponentes pueden ser adicionados (Fishman *et al.*, 1987a y 1987b; Erez *et al.*, 1990 y Erez y Fishman, 1998).

La figura 2 muestra un plano de respuesta que representa el modelo matemático seleccionado. La figura muestra dos fases. La primera en la cual hay ausencia de brotación, cualquiera sea el calor aplicado, satis-

faciendo la definición de endodormancia. La segunda en la cual aparece el "efecto interacción" UFUM-GDH°C ya que es posible obtener el mismo nivel de brotación con diferentes cantidades de frío y de calor, pero además un "efecto aditivo" ya que a mayor frío y calor aplicado le corresponde mayor brotación, todo lo cual conforma la definición de ecodormancia.

Si bien el inicio de la brotación se encuentra en algún punto entre los límites 650-713 y 4.156-5.330 para las unidades de frío y de calor respectivamente, son suficientes 5.336 GDH°C (tabla 1) para alcanzar más del 10% de brotación. Por lo tanto puede ser fijado en 5.336 el valor de GDH°C para calcular las UFUM necesarias para lograr el 10% de brotación. Con el modelo (tabla 2) se calculó la

Tabla 2. Modelos de ajuste UFUM-GDH°C- porcentaje de brotación, variedad "Bing"
 Table 2. Fitting model UFUM-GDH°C- budbreak percentage, "Bing" variety

Modelo UF-GDH°C porcentaje de brotación	Valor P _{modelo}	R ²	EE			
			a	b	c	d
% de brotación = -8,145 + 0,140 · e ^(-UFUM / -337,83) · e ^(-GDH°C / -1861,89)	0,000	0,85	3,1	0,09	34	197

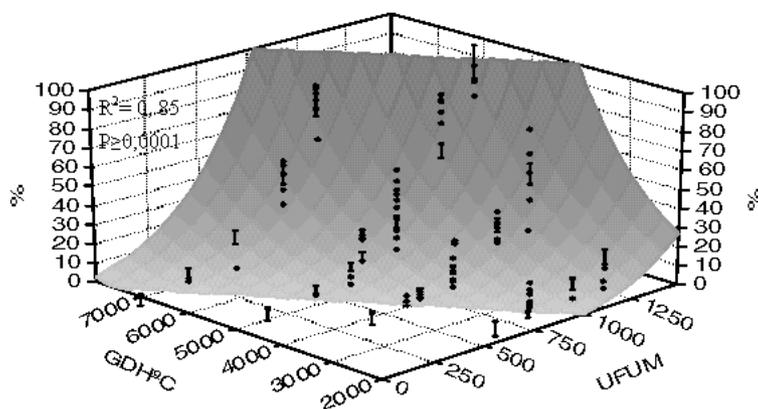


Figura 2. Efecto de la interacción de las UFUM-GDH°C-porcentaje de brotación en materiales en condiciones controladas, variedad "Bing".

Figure 2. Interaction effect of the UFUM-GDH°C-budbreak percentage on materials exposed to controlled condition, "Bing" variety.

cantidad de UFUM para obtener 10% de brotación. Aplicando el modelo, se estima que son necesarias 677 UFUM para iniciar la ecodormancia (10% de brotación) luego de recibir 5.336 GDH°C.

Validación del modelo con datos provenientes de materiales expuestos a condiciones de campo

La tabla 3 muestra los estadígrafos que definen la calidad de ajuste del modelo UFUM-GDH°C-%. El modelo obtenido es un doble exponencial cuyas GDH°C fueron adicionadas a partir de las 677 UFUM. La tabla 3 indi-

ca que el modelo posee un valor $P \leq 0.001$ y que el 79% de la variabilidad observada en los datos es explicada por los valores estimados por el modelo. El modelo calculado responde a la ley de Arrhenius, ya que la brotación es exponencialmente proporcional a las UFUM y a las GDH°C.

La tabla 4 muestra el efecto de las zonas y de los años sobre la relación UFUM-GDH°C-% de brotación. La misma establece que no existen diferencias entre los datos aportados por las diferentes zonas indicando que el cálculo de las UFUM y de las GDH°C "absorben" su variabilidad. Mientras que el efecto "año" aporta información al modelo, sugi-

Tabla 3. Modelos de ajuste UFUM-GDH°C-porcentaje de brotación en materiales expuestos a condiciones de campo, variedad "Bing"

Table 3. Fitting model UFUM-GDH°C-budbreak percentage on materials exposed to field conditions, "Bing" cultivar

Modelo UFUM-GDH°C porcentaje de brotación	Valor P_{modelo}	R^2	EE			
			a	b	c	d
$-39,75+22,84.e^{(UFUM/-2861,33)}.e^{(GDH°C/-9557,52)}$	< 0,001	0,79	8	6	565	1.073

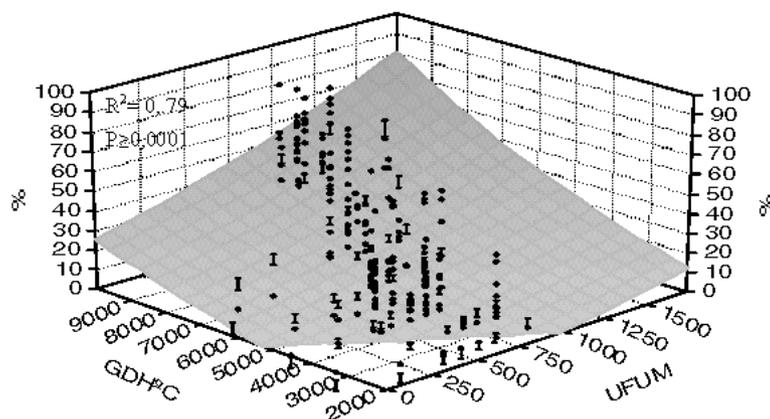


Figura 3. Efecto medio de las UFUM-GDH°C sobre la brotación de yemas vegetativas de la variedad "Bing" durante la dormancia experimentada a campo.

Figure 3. Average effect of UFUM-GDH°C on vegetative budbreak of "Bing" variety during field dormancy.

Tabla 4. Efecto año y zona de producción sobre la brotación de la variedad "Bing"
Table 4. Effect of the year and farm location on budbreak of cherry "Bing" cultivar

Efecto	Descripción	Brotación (%)
Año	2.005	15,34a
	2.006	20,36b
	2.007	34,47c
Zona	Compuertas	27,26a
	Carrodilla	29,27a

Valores dentro de la columna seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos a nivel $P \leq 0,01$.

riendo que tal inestabilidad puede deberse al particular perfil climático de cada año o a diferencias entre el grado de dormición inicial de las yemas (Mendenhall *et al.*, 1995; Tersoglio *et al.*, 2006; Tersoglio y Naranjo, 2007).

A partir del modelo de la tabla 3 se calcula que el porcentaje de brotación obtenido con 677 UFUM y 5.336 GDH°C es del 10,8% valor que difiere sólo ligeramente del resultado esperado (10%).

Discusión

La brotación de las yemas de cerezos requiere primero el cumplimiento de un mínimo de UFUM para luego depender de la interacción UFUM-GDH°C. Estos resultados son consistentes con los de otros trabajos (Richardson *et al.*, 1974; Couvillon, 1995; Erez, 1995; Faust *et al.*, 1997; Tersoglio *et al.*, 2006).

El modelo utilizado estima convenientemente el comportamiento poblacional de la

brotación de las yemas, identificando adecuadamente el requerimiento de frío del inicio de la ecodormancia. Los resultados obtenidos indican que, tanto en condiciones controladas como de campo, el modelo de brotación sigue un comportamiento doble exponencial semejante al propuesto por Fishman *et al.* (1987a y 1987b). Ambos modelos indican que la entrada en la ecodormancia se produce una vez alcanzados aproximadamente 677 UFUM para una cantidad fijada en 5.336 GDH°C.

Para superar la fase de endodormancia la única forma es mediante la aplicación de frío. Por lo tanto, el establecimiento de esa mínima cantidad de frío necesaria permitirá determinar el límite, a partir del cual, los tejidos son "sensibles" a productos reemplazantes de frío como la cianamida hidrogenada lo cual permitirá evaluar sus efectos y eventuales recomendaciones con una base ecofisiológica más sólida (Lang *et al.*, 1987; Faust *et al.*, 1997).

Bibliografía

- Baggiolini A, 1952. Les estades reperés dans le developpment annuel de la vigne et leur utilization pratique. Station fed Essais agric. Lousanne (Switzerland) Publ. 12. p.3.
- Ballard J, 1986. Cherries. Critical temperatures for blossom buds. Washington State University Cooperative Extension. Bulletin 1128.
- Citadin I, MCB Raseira and FG Herter, 2001. Heat requirement for blooming and leafing in Peach. HortScience 36(2): 305-307.
- Cortés A, Gratacós E, 2008. Chilling requirement of ten sweet cherry cultivars in a mild winter location in Chile. Acta Hort. (ISHS) 795: 457-462.
- Couvillon G, 1995. Temperature and stress effects on rest in fruit trees: a review. Acta Hort. 395: 11-19.
- Couvillon GA, Erez A, 1985. Effect of level and duration of high temperature on rest in the peach. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 579-581.
- Dennis FG, 2003. Problems in standardizing Methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. HortScience 38(3): 347-350.
- Egea J, Ortega E, Martinez P, Dicenta F, 2003. Chilling and heat requirement of almond cultivars for flowering. Environmental and Experimental Botany 50: 79-85.
- Erez A, 1995. Means to compensate for insufficient chilling to improve bloom and leafing. Acta Hort. 395: 81-95.
- Erez A, Fishman S, 1998. The dynamic model for chilling evaluation in peach buds. Acta Hort. 465: 507-510.
- Erez A, Fishman S, Lindley-Noakes G, 1990. The Dinamic Model for rest completion in peach buds. Acta Horticulturae 276: 165-174.
- Erez A, Lavee S, Samish RM, 1971. Improved methods for breaking rest in the peach and other deciduous fruit species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96(4): 519-522.
- Faust M, Erez A, Rowland L, Wang S, Norman H, 1997. Bud dormancy in perennial fruit trees: physiological basis for dormancy induction, maintenance and release. HortScience 32(4): 623-629.
- Faust M, Liu D, Wang S, Stutte G, 1995. Involvement of apical winter dormancy of apple buds. Acta Horticulturae 395: 47-56.
- Fishman S, Erez A, Couvillon GA, 1987a. The temperature dependence of dormancy breaking in plants: Two steps model involving cooperative transitions. J. Theor. Biol. 124: 473-483.
- Fishman S, Erez A, Couvillon GA, 1987b. The temperature dependence of dormancy breaking in plants: Computer simulation of process studied under controlled temperatures. J. Theor. Biol. 126: 309-322.
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL, 1987. Endo-, para-, and eco-dormancy physiological

- terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22: 371-377.
- Mahmood K, Carew J, Hadley P, Battey N, 2000. The effect of chilling and post-chilling temperatures on growth and flowering of sweet cherry. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75(5): 598-601.
- Mendenhall W, Sincich T, 1995. *Statistics for engineering and the sciences*. Fourth edition. New Jersey, Prentice hall. (741-749) p 787.
- Mielke EA, Dennis FG, 1975 Hormonal control of flower bud dormancy in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). II. Levels of Abscisic Acid and its water soluble complex *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(3): 287-290.
- Ramina A, Colauzzi M, Masia A, Pitacco A, Caruso T, Messina R, Scalabrelli G, 1995. Hormonal and climatological aspects of dormancy in peach buds. *Acta Hort.* 395: 35-46.
- Richardson E, 1975. Comments on a model for estimating the completion of rest for Red Haven and Elberta peach trees. *HortScience* 10(6): 559-562.
- Richardson EA, Anderson JL, Campbell RH, 1986. The omnidata biophenometer (TA45-P): A chill unit growing degree hour accumulator. *Acta Hort.* 184: 95-100.
- Richardson E, Seeley SD, Walter DR, 1974. A model for estimating the completion of rest for "Red-haven" and "Elberta" Peach Trees. *HortScience* 9(4): 331-332.
- Schmidt H, Vittrup-Christensen J, Watkins R, Smith RA, 1985. *Cherry Descriptors*. IBPGR 85/37. ECSC, EEC, EAEC, Brussels, Luxemburg and International Board for plant Genetic Resources, Rome. Italy. 28p.
- Seeley SD, 1996. Modelling climatic regulation of bud dormancy. P361-376 En: Lang GL (Ed.) *Plant Dormancy: Physiology, biochemistry, and molecular biology*. CAB Int. Wallingford, Oxon, UK.
- Seif S, Gruppe W, 1985. Chilling requirements of sweet cherries (*Prunus avium*) and interspecific cherry hybrids. *Acta Hort.* 169: 289-294.
- Shaltout AD, Unrath CR, 1983. Rest completion prediction model for Starkrimson Delicious Apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 957-961.
- Tersoglio E, Naranjo G, Rivero L, Quiroga M, 2006. Requerimientos de frío invernal y de calor en variedades de cerezos. *ITEA* 102 (3): 251-259.
- Tersoglio E, Naranjo G, 2007. Características del frío invernal de las zonas productoras de cerezas de la provincia de Mendoza, Argentina. Parte I. *ITEA* 103(4): 186-197.
- UC Fruit & Nut Reserch Information Center, 2006. About chilling unit, hours and portions. University of California. Disponible: <http://fruit-sandnuts.ucdavis/weather/aboutchilling.shtml> (consulta 2007).
- UPOV, 1995. Guidelines for the conduct of test for distinctness uniformity and stability. Cherry. TG/35/7 Union Internationale pour la Protection des obtentions Végétales. Switzerland, 25p.
- UPOV. 2006. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. www.upov.int/es/publications/tg-rom/tg035/tg-35-7.pdf
- Vallejo V, Mestre J, Roca M, 2002. Organografía y fenología de frutales. Depart. de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Univ. de Lleida. <http://www.fruticultura.udl.es/fenologia/cer.htm>.
- Werner D, Mowrey B, Young E, 1988. Chilling requirement and post-rest heat accumulation as related to difference in time of bloom between peach and western san cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 775-778.

(Aceptado para publicación el 21 de julio de 2009)

Prolina en tejidos y exudados de raíz como respuesta al estrés salino de cultivos de raíces aisladas de patrones frutales del género *Prunus*

J.A. Marín, P. Andreu, A. Carrasco, A. Arbeloa

Estación Experimental de Aula Dei-CSIC
Av. Montañana 1005. 50059 Zaragoza España.
jmarin@eead.csic.es

Resumen

La salinidad es una causa de estrés abiótico muy importante para el desarrollo de las plantas y un grave problema para la agricultura. La presencia de sal disminuye las cosechas en una gran variedad de plantas, por lo que la tolerancia a la salinidad es un carácter importante en mejora de plantas. Sin embargo, estas técnicas son largas y costosas, sobre todo en especies frutales debido a sus dilatados periodos de crecimiento y se beneficiarían del desarrollo de técnicas de selección precoz. Por otra parte, la acumulación de prolina, tanto en los tejidos de hoja como de raíz, ha sido relacionada con el estrés salino, indicando un papel esencial en la tolerancia.

En este trabajo se estudia el contenido de prolina en raíces y en sus exudados, a partir de cultivos asépticos de raíces aisladas como modelo experimental, bajo estrés salino, para conocer el posible papel de la prolina como marcador de tolerancia.

En los tejidos de las raíces la prolina aumentó con el estrés siendo muy elevada a 180 mM de NaCl donde no hubo crecimiento de las raíces. Además, la presencia de prolina en el exudado de raíces aisladas estuvo también relacionada con la concentración de sal y siguió un patrón similar en tres patrones frutales que pertenecen a diferentes especies del género *Prunus* (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' y *P. dulcis x persica*, GF 677). Estos resultados resaltan la necesidad de nuevos estudios para establecer si la prolina puede ser, en determinadas condiciones, un marcador de la tolerancia de los frutales a la salinidad. Los exudados permitirían, entonces, estudiar la tolerancia con test no destructivos.

Palabras clave: selección precoz, NaCl, estrés abiótico, *Prunus insititia*, *Prunus cerasus*, *Prunus dulcis x persica*.

Summary

Proline content in root tissues and root exudates as a response to salt stress of excised root cultures of *Prunus* fruit tree rootstocks

The aim of this work is to demonstrate the presence of proline in both root tissues and root exudates as a response of excised root cultures to salt stress and to ascertain the possible relationship between proline content and NaCl concentration.

Roots from micropropagated *Prunus* rootstocks have been cultured in vitro under increasing NaCl concentrations (0, 20, 60 and 180 mM) to early detect their tolerance to salt stress. After 3 weeks of culture, the proline content of the MS-based liquid medium, in which roots were cultured, was determined. As far as we know, no attempts have been made to determine the proline content of excised root cultures and root exudates under stress.

Proline concentration in root tissues and root exudates from all rootstocks increased as salt concentration in the medium increased, following a trend similar to that of whole plant tissues in all three *Pru-*

nus rootstocks (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' and *P. dulcis x persica*, GF 677). This opens the possible role of proline exudates to study plant responses to salt stress using non-destructive methods. In addition, proline exudates can be of great interest in the early detection of salt stress tolerance, provided that a relation between proline and salt stress tolerance could be found.

Key words: Early selection, NaCl, abiotic stress, *Prunus insititia*, *Prunus cerasus*, *Prunus dulcis x persica*.

Introducción

La salinidad es un factor abiótico de estrés muy importante para el desarrollo de las plantas (Sengupta y Majumder, 2009) y un grave problema para la agricultura, especialmente en tierras irrigadas de zonas semiáridas donde el 20-30% de las tierras están seriamente dañadas por la sal (FAO, 2002). Altas concentraciones de sal en los suelos disminuyen las cosechas en una gran variedad de plantas en todo el mundo (Gorai y Neffati, 2007).

La tolerancia a la salinidad es por tanto un carácter importante en mejora de plantas que de esta forma incrementarían las cosechas, principalmente en zonas marginales (Türkan y Demiral, 2009). Mediante técnicas de selección y mejora tradicionales se ha conseguido mejorar considerablemente la tolerancia a la salinidad de plantas con importancia agrícola (Ashraf y Harris, 2004) aunque estas técnicas son largas y costosas. Esto se aplica especialmente a la selección de material vegetal de frutales debido a sus largos periodos de crecimiento, por lo que se beneficiaría de estrategias que permitirían acortar estos procesos.

El cultivo in vitro ha demostrado ser una técnica aplicable para el estudio del estrés salino (Naik y Widholm, 1993; Woodward y Bennett, 2005) y recientemente ha sido usado para la selección de plantas de tomate y *Vigna radiata* tolerantes a la salinidad

(Hassan et al., 2008). Por otra parte, la acumulación de solutos como la glicina o la prolina ha sido relacionada con estrés hídrico, salino y otros estreses abióticos de la planta (Ashraf y Harris, 2004; Munns y Tester, 2008; Lu et al., 2009) indicando un papel esencial en la tolerancia a estos estreses. La prolina se acumula bajo estrés salino en los tejidos tanto de hoja como de raíz (Aziz et al., 1999) atribuyéndole un posible papel protector frente al potencial osmótico generado por la sal (Watanabe et al., 2000; Chen et al., 2007).

En este trabajo se propone el estudio de la acumulación de prolina en relación al estrés salino con un nuevo y simplificado modelo basado en el cultivo in vitro de raíces aisladas de patrones frutales de *Prunus* (Marín y Marín, 1998). Estas raíces sometidas a concentraciones salinas crecientes (Andreu et al., 2009) presentaron diferencias en el crecimiento en longitud y en la acumulación de almidón entre especies con distinta tolerancia a la sal. El modelo permite estudiar el efecto del estrés en el lugar donde se aplica, en lugar de estudiarlo en planta entera o en zonas alejadas del origen de la fuente de sal. El cultivo de raíces in vitro ha mostrado en trabajos previos una cierta correlación con la tolerancia en organismos enteros (Vijayan et al., 2003) y ha resultado ser un modelo eficaz en la detección precoz de la tolerancia a la sal en *Prunus*. Una patente ha sido solicitada para la protección de este procedimiento (Andreu et al., 2008). Sin

embargo, el crecimiento en condiciones de estrés no ha sido relacionado con la acumulación de prolina en los tejidos o el exudado de la raíz. La composición del exudado de las raíces podría tener funciones de protección, ajuste de pH o potencial redox, entre otras, en condiciones de estrés para la planta y dada la influencia de los microorganismos de la rizosfera en el metabolismo de estos exudados (Suzuki *et al.*, 2009) el estudio de los exudados en condiciones asépticas, como las desarrolladas en este método de cultivo de raíces aisladas, permitirá la comparación en distintas condiciones de estrés salino.

El objetivo de este trabajo es estudiar la presencia de prolina en raíces aisladas y su relación con el estrés salino. Para la determinación de la prolina, se realiza previamente una puesta a punto del método con este tipo de tejidos crecidos en altas concentraciones de sacarosa, que pueden interferir en la medida de la prolina (Magné y Larher, 1992; Trotel-Aziz *et al.*, 2000).

Además, se estudia por primera vez la presencia de prolina en los exudados de raíces sometidas a concentraciones crecientes de sal en el medio de cultivo. Este método posibilitaría en un futuro el desarrollo de un test de tolerancia no destructivo, analizando el medio en el que se desarrollan las raíces y viendo la respuesta frente al estrés.

Material y métodos

Material vegetal

Raíces de los patrones 'Adesoto 101' (*Prunus insititia*), GF 677 (*P. dulcis* x *P. persica*) y 'Masto de Montañana' (*P. cerasus*) micropropagados y enraizados *in vitro* se usaron para su puesta en cultivo en condiciones de estrés (Andreu y Marín, 2005).

Cultivo de raíces aisladas

Se utilizaron ápices de raíces de 10mm de longitud. Los ápices en número de 10 por tratamiento, se colocaron en frascos de cultivo con 30ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con un 3% de sacarosa y sin reguladores de crecimiento (Andreu *et al.*, 2009). El estrés salino se aplicó añadiendo al medio de cultivo concentraciones crecientes de NaCl: 0 (control), 20, 60 y 180mM. En el medio de cultivo a 25° C la conductividad (E.C.) total fue de 6,0; 8,2; 12,5 y 23,6 dS.m⁻¹ respectivamente. Se mantuvieron en la cámara de cultivo a 24° C, en oscuridad y a 90 rpm en un agitador orbital durante 3 semanas (Andreu *et al.*, 2009). Los experimentos se repitieron 2 veces.

Determinación de la prolina

La determinación de la prolina se realizó siguiendo el método descrito por Bates *et al.* (1973) basado en la reacción de la prolina con la ninhidrina. El método se validó para la posible interferencia de sacarosa (Magné y Larher, 1992; Trotel-Aziz *et al.*, 2000), presente en el medio de cultivo, mediante la determinación de la prolina en soluciones de ácido sulfosalicílico (3 %) con distintas concentraciones de prolina a las que se añadió, o no, sacarosa (90mM) a una concentración similar a la del medio de cultivo de las raíces aisladas. Finalmente se compararon los resultados de absorbancia obtenidos. Para la determinación de la prolina las diluciones se mezclaron en una proporción 1:1:1 con ninhidrina ácida y ácido acético glacial, incubándose a 100° C durante 1 hora. La reacción se detuvo en un baño de hielo y el cromóforo se extrajo añadiendo 4ml de tolueno. La absorbancia se midió a 520 nm en un espectrofotómetro BioMate (Thermo Spectronic). Los resultados se analizaron con ANOVA.

La concentración de prolina en exudados y tejidos de raíz se determinó después de tres semanas en cultivo en condiciones de estrés. Posteriormente se midió la longitud de las raíces y se mantuvieron congeladas hasta el momento de su utilización. El exudado se filtró con un filtro Acrodisc con doble membrana de 0,8 y 0,2 μ m y se mantuvo congelado hasta su liofilización en un liofilizador Genesis 25EL (Virtis, Gardiner, EEUU). El exudado liofilizado se resuspendió con 1,2 ml de ácido sulfosalicílico al 3% y una vez centrifugado (10 min a 12000 rpm) se mezcló en una proporción 1:1:1 con ninhidrina ácida y ácido acético glacial. La reacción y determinación de la prolina se realizó de manera similar a lo descrito anteriormente.

La concentración de prolina en tejidos de raíz se determinó triturando las raíces congeladas. Posteriormente 0,5 g de triturado se mezclaron con 2ml de ácido sulfosalicílico al 3%. El sobrenadante después de la centri-

fugación se mezcló en una proporción 1:1:1 con ninhidrina y ácido acético glacial. La reacción y determinación de la prolina se realizó de manera similar a lo descrito anteriormente. Se realizaron las correspondientes curvas patrón para cada determinación dentro del rango de detección del método (0-39 μ g. ml⁻¹).

Resultados

1. Interferencia de la sacarosa

La presencia de sacarosa, a la concentración utilizada en el medio de cultivo, no ha interferido de forma significativa en la medida de la concentración de prolina de soluciones patrón de prolina de concentraciones crecientes analizadas siguiendo el método de Bates (Bates *et al.*, 1973). En la figura 1 se

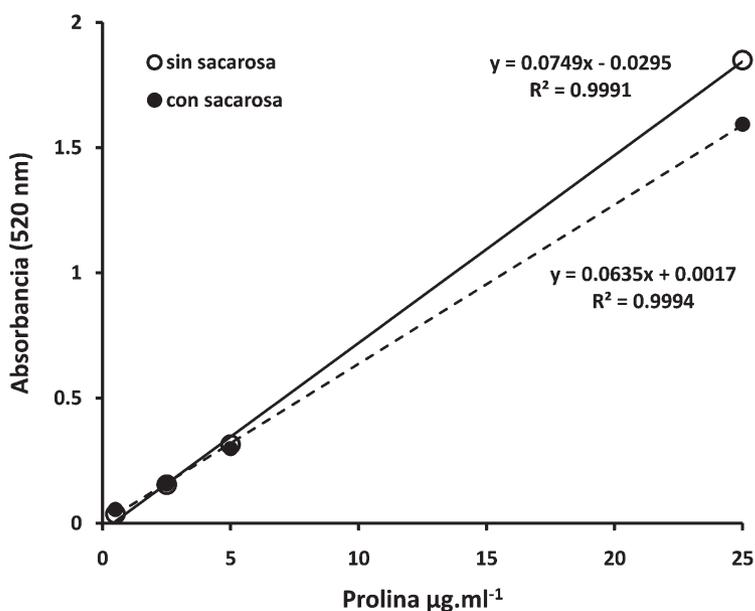


Figura 1. Efecto de la sacarosa (90 mM) en la determinación de prolina en soluciones patrón.
 Figure 1. Effect of sucrose (90 mM) in proline determination of standard solutions.

muestra que no existieron diferencias apreciables en la determinación de prolina, excepto una menor valoración de la concentración más alta ($25 \mu\text{g.l}^{-1}$) en presencia de sacarosa (90 mM). La comparación de los dos conjuntos de datos de prolina, con y sin sacarosa añadida, no tuvo diferencias significativas según el ANOVA correspondiente ($F=1.42$, $p=0.286$, con 1 y 5 g.l.)

Dado que la sacarosa incluida en el medio de cultivo no interfirió de forma significativa en la cuantificación de prolina, se utilizó este método en las determinaciones de prolina de este trabajo.

2. Determinación de la prolina en cultivos de raíces aisladas y sometidas a estrés

La concentración de prolina en los tejidos de raíces aisladas del patrón 'Adesoto 101' cultivadas in vitro y sometidas a concentraciones crecientes de NaCl se determinó tras tres semanas de cultivo. La prolina en los tejidos de las raíces aumentó con el estrés siendo muy elevada a 180 mM de NaCl

(Figura 2A), donde prácticamente no hubo crecimiento de las raíces.

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de prolina en el exudado de las raíces aisladas, determinando la concentración de prolina en el medio de cultivo. La concentración de prolina en el exudado aumentó, al igual que en los tejidos de raíz, según aumentó el estrés salino al que fueron sometidos (Figura 2B).

3. Determinación de la prolina en exudados de patrones de distintas especies de *Prunus*

El análisis del exudado de raíces cultivadas de patrones de distintas especies de *Prunus* (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' y *P. dulcis x persica*, GF 677) y sometidas a concentraciones crecientes de sal demostró la presencia de prolina en los exudados de las tres especies estudiadas. Los exudados incrementaron su contenido en prolina conforme aumentó la concentración de NaCl. A la mayor concentración, 180

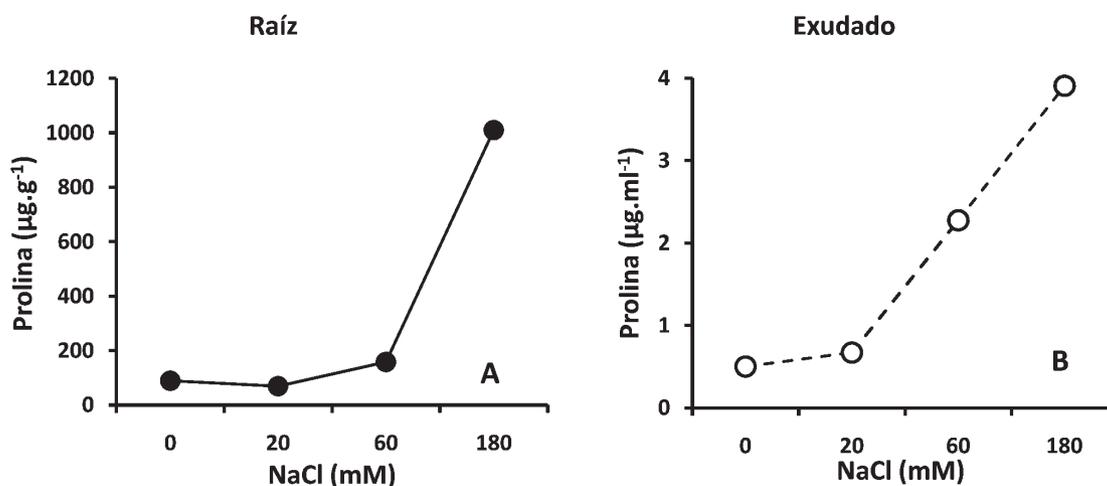


Figura 2. Concentración de prolina en (A) raíces aisladas cultivadas y (B) en el medio de cultivo (exudado).
Figure 2. Proline concentration in (A) cultured excised roots and (B) in the culture medium (exudate).

mM de NaCl, las tres especies presentaron unos valores muy elevados y variables: 'Adesoto 101', 1.67 $\mu\text{g/ml}$; GF 677, 1.07 $\mu\text{g/ml}$ y 'Masto de Montañana', 17.64 $\mu\text{g/ml}$. El incremento de prolina observado a menores concentraciones de NaCl (0-60 mM) mostró un patrón de aumento similar en los tres patrones, en relación al aumento de la concentración de sal del medio de cultivo (Figura 3).

Discusión

Los resultados presentados en este trabajo muestran que 1) la prolina se acumula en las raíces aisladas cultivadas in vitro como res-

puesta a la aplicación de un estrés salino, de forma similar a lo que sucede en planta entera y 2) la prolina se encuentra igualmente en los exudados de las raíces, recogidos en el medio de cultivo líquido.

La determinación de prolina se realiza desde antiguo en numerosos trabajos de selección frente a estreses abióticos como la sequía y posteriormente, la salinidad, mediante un método rápido, sencillo y suficientemente preciso, basado en la reacción de la prolina con la ninhidrina (Bates et al., 1973). Sin embargo, se ha descrito una interferencia de la sacarosa con la prolina que podría afectar su determinación (Magné y Larher, 1992; Trotel-Aziz et al., 2000). Dado que el modelo experimental

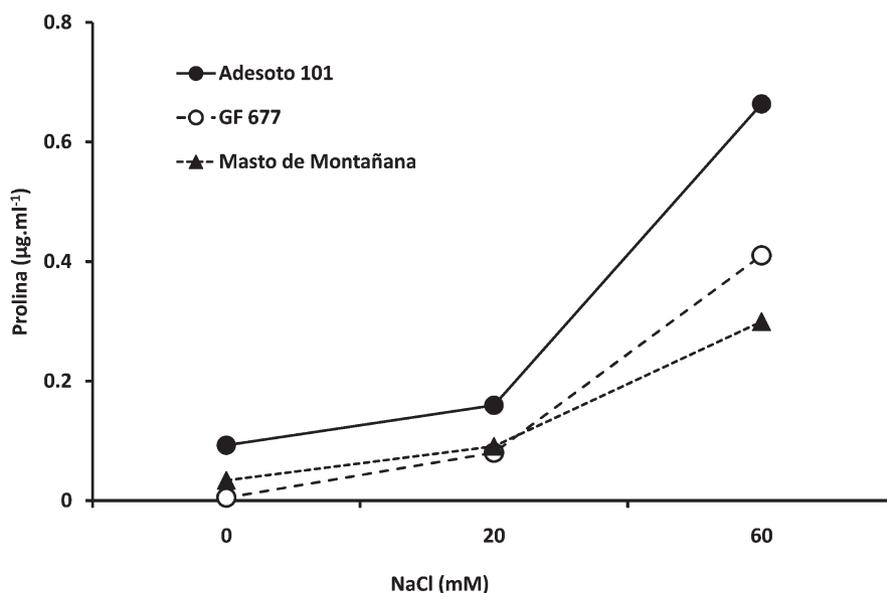


Figura 3. Concentración de prolina exudada en el medio de cultivo por las raíces de diferentes patrones del género *Prunus* (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' y *P. dulcis x persica*, GF 677).

Figure 3. Proline concentration exudated into the culture medium from excised roots of different *Prunus* rootstocks (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' and *P. dulcis x persica*, GF 677).

empleado en este trabajo consiste en el cultivo de raíces aisladas in vitro en un medio de cultivo líquido con una concentración de sacarosa relativamente alta (88 mM), se efectuó una valoración de soluciones de prolina de concentración creciente en ácido sulfosalicílico (3 %) con o sin sacarosa (90 mM) añadida. Sin embargo, las absorbancias a 520 nm del resultado de la reacción de la ninhidrina mostraron que a esa concentración de sacarosa, el posible efecto de la sacarosa no es significativo. Consecuentemente, para la determinación de la prolina en este trabajo se utilizó el método descrito por Bates et al. (1973) que presenta ventajas importantes como su rapidez y sencillez.

El cultivo de raíces aisladas ha resultado ser un modelo experimental muy adecuado para la detección precoz de la tolerancia a estreses abióticos como la salinidad (Marín y Marín, 1998; Hossain et al., 2004; Suzuki et al., 2009, Andreu et al., 2009). Entre las ventajas del modelo se encuentra la rápida respuesta de los ápices radicales al estrés (3 semanas) con crecimientos longitudinales decrecientes a medida que el estrés aumenta. Además, se observó una acumulación de almidón en la zona de maduración de la raíz que estaba relacionada indirectamente con el estrés aplicado. Por otra parte, se encontró una buena correspondencia entre la respuesta al estrés de las raíces aisladas y de la planta entera, lo que permite su utilización como herramienta en la selección precoz de patrones de especies frutales (Andreu et al., 2008). Asimismo, el modelo nos permite estudiar los exudados de las raíces al aplicarles distintas presiones de estrés en condiciones asépticas, sin interferencia de microorganismos de la rizosfera (Suzuki et al., 2009).

Numerosos estudios han relacionado la acumulación de prolina frente al estrés salino (Aziz et al., 1999; Munns y Tester, 2008) atribuyéndole un posible papel protector

frente al potencial osmótico generado por la sal (Chen et al., 2007; Hoque et al., 2008). Este modelo ha permitido observar si la acumulación de prolina se encontraba entre las respuestas de las raíces aisladas al estrés salino. Tanto en los tejidos de las raíces aisladas, como en sus exudados, se han encontrado, por primera vez, concentraciones crecientes de prolina en respuesta a mayores concentraciones de NaCl. Además, los exudados mantienen, al igual que las raíces, una fuerte relación con la concentración de sal del medio de cultivo en el que crecieron las raíces, es decir, con la intensidad del estrés (coeficientes de correlación de 0.99 para 'Masto de Montañana' y GF677 y de 0.97 para 'Adesoto 101' en el rango de 0 a 60 mM de NaCl). A 180 mM de NaCl el estrés es máximo en relación a las mayores concentraciones de prolina encontradas en el exudado, a pesar de que la actividad de las raíces a esta concentración es mínima, no apreciándose crecimiento longitudinal.

El hecho de que patrones pertenecientes a especies diferentes de *Prunus* muestren una respuesta similar al estrés mediante la acumulación de prolina en tejidos y exudados permite sugerir que es un mecanismo muy conservado en el género *Prunus*, que además podría generalizarse a otros géneros frutales como *Malus* y *Pyrus*.

Los resultados de este trabajo resaltan la necesidad de nuevos estudios para establecer si la prolina puede ser, en determinadas condiciones, un marcador de la tolerancia de los frutales a la salinidad. La evaluación de la respuesta al estrés salino de la acumulación de prolina en los tejidos o, preferentemente, en los exudados de la raíz, puede estar relacionada con el grado de tolerancia a la salinidad de los distintos clones. Los exudados permitirían, entonces, estudiar la tolerancia con tests no destructivos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado, en parte, como Grupo de Excelencia A-43 por el Gobierno de Aragón. Agradecemos a M. Joy (CITA-DGA) su ayuda en la liofilización de las muestras de exudados.

Bibliografía

- Andreu P, Marín JA, 2005. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Sci Hort.*106: 258-267.
- Andreu P, Arbeloa A, Andreu P, 2008. Método para la detección precoz de patrones de frutales tolerantes al estrés salino. Solicitud de patente a la Oficina Española de Patentes y Marcas num P200803727.
- Andreu P, Arbeloa A, Lorente P, Marín JA, 2009. Excised root cultures of *Prunus* rootstocks were affected by increasing NaCl concentrations in accordance to their salt tolerance in vivo (enviado).
- Ashraf M, Harris, P, 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F, 1999. Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Science* 145: 83-91.
- Bates L, Waldren RP, Teare ID, 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Chen Z, Cuin TA, Zhou M, Twomey A, Naidu BP, Shabala S, 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 4245-4255.
- FAO, 2002. Crops and Drops. Making the best use of water for agriculture. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Roma, 26 pp.
- Gorai M, Neffati M, 2007. Germination responses of *Reaumuria vermiculata* to salinity and temperature. *Ann. Appl. Biol.* 151: 53-59.
- Hassan N, Serag MS, El-Feky FM, Nemat Alla MM, 2008. In vitro selection of mung bean and tolerance to NaCl. *Ann Appl Biol* 152: 319-330.
- Hoque MA, Banu MN, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y, 2008. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 813-824.
- Hossain Z, Mandal AK, Shukla R, Datta SK, 2004. NaCl stress - its chromotoxic effects and antioxidant behavior in roots of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Plant Science* 166: 215-220.
- Lu SY, Chen CH, Wang ZC, Guo ZF, Li HH, 2009. Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *Cynodon dactylon*) to drought stress. *Plant Cell Reports* 28: 517-526.
- Magné C, Larher F, 1992. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* 200: 115-118.
- Marín ML, Marín JA, 1998. Excised rootstock roots cultured in vitro. *Plant Cell Rep.* 18: 350-355.
- Munns R, Tester M, 2008. Mechanisms of salt tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Naik PS, Widholm JM, 1993. Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 33: 273-280.
- Sengupta S, Majumder AL, 2009. Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: a physiological and proteomic approach. *Planta* 229: 911-929.

- Suzuki K, Okazaki K, Tawaraya K, Osaki M, Shinano T, 2009. Gas chromatography-mass spectrometry associated global analysis of rice root exudates under aseptic conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 55: 505-513.
- Trotel-Aziz P, Niogret MF, Larher F, 2000. Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs recovery from hyper-osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 110: 376-383.
- Türkan I, Demiral T, 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9.
- Vijayan K, Chakraborti SP, Ghosh PD, 2003. In vitro screening of mulberry (*Morus spp.*) for salinity tolerance. *Plant Cell Rep.* 22: 350-357.
- Watanabe A, Kojima K, Ide Y, Sasaki S, 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 63: 199-206.
- Woodward AJ, Bennett IJ, 2005. The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82: 189-200.
- (Aceptado para publicación el 19 de noviembre de 2009)

Efecto de la duración de la fase de volteo de los huevos de perdiz roja (*Alectoris rufa*) durante la incubación sobre la tasa de eclosión

P. González-Redondo¹, S. De la Rosa Sánchez

Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Universidad de Sevilla. Ctra. de Utrera km 1. 41013 Sevilla, Tel. 954486449; Fax 954486436; e-mail: pedro@us.es

Resumen

El volteo de los huevos en la incubación artificial es clave para lograr buenas tasas de eclosión y pollos viables. En la producción de perdiz roja (*Alectoris rufa*) la duración recomendada para el periodo durante el que los huevos deben ser volteados en la incubación no se ha comprobado experimentalmente. Para contribuir al conocimiento de la duración óptima del periodo de volteo, se incubaron 74 huevos divididos en tres grupos: huevos volteados hasta el día 18 ó 19, volteados hasta el día 20 ó 21 y volteados hasta el día 22 de incubación. La tasa de eclosión fue mayor en los huevos volteados durante 20 días o más.

Palabras clave: Granjas cinegéticas, fertilidad, ganadería alternativa, *Phasianidae*.

Summary

Effect on hatchability of length of time for turning eggs during the incubation in Red-legged partridge (*Alectoris rufa*)

Turning of the eggs during the artificial incubation is critical in order to obtain a good hatchability and viable one-day-old chicks. In Red-legged partridge (*Alectoris rufa*) farming, the recommended length of time during which the eggs should be turned along the incubation process has not been experimentally tested. With the aim of improving knowledge on the optimum length of time for the eggs to be turned during the incubation, seventy four eggs were incubated, divided into three groups: eggs that were turned until day 18 or 19, eggs that were turned until day 20 or 21, and eggs that were turned until day 22 of incubation. The hatchability of the eggs was higher for the eggs that were turned during the incubation over at least 20 days.

Key words: Game farming, fertility, alternative livestock, *Phasianidae*.

Introducción

La producción de perdiz roja (*Alectoris rufa*) tiene amplia difusión en España desde hace cuatro décadas, existiendo cen-

tenares de granjas (González-Redondo, 2004; Sánchez García-Abad *et al.*, 2009). Pese a la importancia de las granjas de perdiz roja en países como España, Francia y Portugal, diversos aspectos del manejo de

1. Autor para correspondencia

la incubación artificial, que es clave para la viabilidad de las granjas cinegéticas (Pérez y Pérez, 1981; González-Redondo, 2004), no han sido investigados aún con rigor. Así, la transferencia de los huevos desde la incubadora, donde se voltean regularmente, a la nacedora, donde ya no se voltean en espera de la eclosión, influye en la viabilidad de los huevos porque el volteo regular de los huevos durante la incubación artificial cumple la misma función que la rotación periódica que la hembra les proporciona en el nido. Favorece la movilidad de las estructuras internas del huevo, necesaria para evitar que el embrión adopte posiciones defectuosas, que producen deformaciones y adherencias de éste con las membranas que lo rodean, en particular del corion con las membranas testáceas (New, 1957; Martínez-Alesón, 2003). En *A. rufa* la transferencia de los huevos a la nacedora, cesando el volteo, se recomienda realizarla el día 20 ó 21 de incubación (Pérez y Pérez, 1981; Cancho, 1991; García Martín, 2003) pero esta recomendación figura en publicaciones divulgativas que no aportan evidencias experimentales específicas para la especie. Por eso, el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto sobre la tasa de eclosión de los huevos de *A. rufa* del cese del volteo en diferentes momentos comprendidos entre los 18 y 22 días de incubación.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 74 huevos procedentes de una granja de perdiz roja de la provincia de Córdoba, escogidos aleatoriamente en junio de 2006 de parejas reproductoras alojadas en jaulas al aire libre, alimentadas con pienso comercial (20% PB) y sometidas a suplementación artificial del fotoperiodo (16 horas de luz, natural+artificial). Los huevos habían

sido puestos entre uno y tres días antes de cargarlos en la incubadora, conservándose entre tanto a 15 °C y 80% HR. Diez horas antes de cargarlos en la incubadora se precalentaron a 23 °C y 65% HR manteniéndolos en la sala donde estaba la incubadora. Se incubaron a 37,8 °C y 55% HR hasta los 20 días, y a 37,5 °C y 80% HR desde entonces hasta la eclosión. Se utilizó una incubadora (modelo HS 25; Masalles, Ripollet) con control automático de volteo, de temperatura con sistema proporcional auto-tuning, de humedad y de ventilación forzada mediante ventilador, que trabajó en carga única conteniendo exclusivamente los huevos de la experiencia. Los huevos se dividieron aleatoriamente en tres lotes, que se mantuvieron volteándose 45° a cada lado de la vertical con una frecuencia horaria hasta los 18 ó 19 días (lote 1), hasta los 20 ó 21 días (lote 2) y hasta los 22 días de incubación (lote 3), cesando el volteo a partir de entonces, cuando fueron colocados horizontalmente en la bandeja nacedora de la misma incubadora. Los grupos experimentales se constituyeron así por tratarse de periodos inferior (18 y 19 días), igual (20 y 21 días) y mayor (22 días) que los recomendados en la literatura para la duración de la etapa de volteo. Tras 23-24 días de incubación se registró el número de perdigones nacidos y el de huevos no eclosionados. La fertilidad de los huevos no eclosionados se determinó abriéndolos y analizando la presencia de embrión (Ernst *et al.*, 2004; Muriel y Serrano, 2007). Usando SPSS 15.0 (SPSS Inc., 2006) se analizaron las diferencias en la fertilidad, en la tasa de eclosión del total de huevos incubados y en la tasa de eclosión de los huevos fértiles, mediante tablas de contingencia en las que se calcularon tests chi-cuadrado y residuos tipificados corregidos de Haberman (discriminando cuando $R > 1,96$ y $R < -1,96$ para un nivel de confianza del 95%).

Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra la fertilidad, tasa de eclosión del total de huevos incubados y tasa de eclosión de los huevos fértiles según la duración del periodo de volteo. La fertilidad media (62,2%) fue inferior a la descrita para esta especie en cautividad (74-82%, Bagliacca *et al.*, 1988; Paci *et al.*, 1992; González-Redondo, 2006). La tasa de eclosión media del total de los huevos incubados (51,4%) también fue inferior a la descrita en la bibliografía (53-84%, Mori *et al.*, 1985; Paci *et al.*, 1992; González-Redondo, 2006). Esto se debió a que eran huevos del final de la estación reproductora, cuando disminuye la fertilidad a causa de la estacionalidad reproductiva de la especie (Pérez y Pérez, 1981; González-Redondo, 2006). La tasa de eclosión media de los huevos fértiles (82,6%) estuvo dentro del rango descrito en la literatura (73-92%, Bagliacca *et al.*, 1988; Paci *et al.*, 1992; González-Redondo, 2006). La tasa de eclosión de los huevos incubados y la de los fértiles siguieron pautas de variación similares en los tres grupos experimentales,

como ilustran los residuos tipificados corregidos (tabla 1), siendo mayor la de los huevos fértiles al no incluir los huevos sin fecundar.

Éste es el primer estudio que investiga en *A. rufa* el efecto que sobre la tasa de eclosión tiene la duración de la etapa de la incubación en que se voltean los huevos. Encontramos diferencias significativas en las tasas de eclosión de los huevos incubados y de los huevos fértiles de perdiz roja en función del número de días que fueron volteados durante la incubación (tabla 1). Los huevos que dejaron de voltearse antes de los 20 días de incubación mostraron una tasa de eclosión inferior que la de los volteados 20 días o más. Nuestros resultados confirman, en lo referente a la duración del periodo de volteo, la recomendación establecida en publicaciones divulgativas sobre incubación de huevos de perdiz roja en granjas cinegéticas, en el sentido de que los huevos deben transferirse a los 20 ó 21 días de incubación desde la incubadora, donde son volteados, a la nacedora, donde dejan de voltearse en espera de la eclosión (Pérez y Pérez, 1981; Cancho, 1991; Setién, 1991; García Martín, 2003).

Tabla 1. Efecto de la duración del periodo de volteo sobre la tasa de eclosión de huevos de perdiz roja. Análisis de la fertilidad en los lotes experimentales

Table 1. Effect on hatchability of length of time for turning eggs during the incubation in red-legged partridge. Analysis of the fertility in the experimental batches

Duración del periodo de volteo (días de incubación)	Huevos (n)			Fertilidad ^{1,2} (%)	Tasa eclosión de huevos (%)	
	Incubados	Fértiles	Eclosionados		Incubados ^{1,2}	Fértiles ^{1,2}
18 ó 19	30	15	9	50,0 a (R = -1,8)	30,0 b (R = -3,0)	60,0 b (R = -2,8)
20 ó 21	29	20	18	69,9 a (R = 1,0)	62,1 a (R = 1,5)	90,0 a (R = 1,2)
22	15	11	11	73,3 a (R = 1,0)	73,3 a (R = 1,9)	100,0 a (R = 1,7)
Total	74	46	38	62,2	51,4	82,6
Significación				0,197	0,008	0,015

¹ Distinta letra en la misma columna indica diferencias significativas (P < 0,05).

² Entre paréntesis, residuos tipificados corregidos de Haberman.

Un análisis de los residuos de Haberman (tabla 1) reveló que los huevos para los que se prolongó el volteo hasta los 22 días de incubación mostraron una tendencia, aunque no significativa, a tener mayor tasa de eclosión, pues los residuos se aproximaron a 1,96, valor por encima del cual los huevos de ese lote experimental habrían tenido una tasa de eclosión mayor que la media. En cualquier caso, nuestros resultados confirman la observación de algunos perdicultores en el sentido de que cuanto más se retrase la transferencia de los huevos desde la incubadora a la nacedora, mejor tasa de eclosión se obtiene. Evidentemente, como la incubación de los huevos de perdiz roja dura 23-24 días (Pérez y Pérez, 1981), no sería factible retardar a partir del día 22 de incubación dicha transferencia de los huevos a la nacedora porque habría riesgo de que algunos huevos con desarrollo más adelantado eclosionasen en las bandejas de incubación, causando pérdidas de perdigones por accidentes.

En gallina se conoce que cuanto más se prolonga el periodo de volteo durante la incubación, mayor es la tasa de eclosión de los huevos fértiles (North y Bell, 1990, citado por Martínez-Alesón, 2003). También se conoce que es más perjudicial la ausencia de volteo en las fases tempranas de incubación (New, 1957). Aunque numerosos autores citan como insignificante el efecto del volteo durante el último tercio del periodo incubatorio (revisado en Elibol y Brake, 2006), nuestros resultados revelan que, cuando se voltean los huevos de perdiz roja hasta la tercera semana de incubación se obtiene mayor tasa de eclosión manteniéndolo al menos hasta los 20 días.

En conclusión, es recomendable mantener el volteo de los huevos de perdiz roja con frecuencia horaria al menos hasta los 20 días de incubación, confirmándose la idoneidad de las propuestas propugnadas en publicaciones divulgativas.

Referencias bibliográficas

- Bagliacca M, Mori B, Gualterio L, 1988. Egg laying under artificial photo-regulation in the red partridge. 18th World's Poultry Congress, Nagoya, Japan: 657-659.
- Cancho M, 1991. Incubación. Equipo y técnicas de manejo. Control. En: La perdiz roja. Ed. Fundación La Caixa-AEDOS. Barcelona, pp. 21-27.
- Elibol O, Brake J, 2006. Effect of flock age, cessation of egg turning, and turning frequency through the second week of incubation on hatchability of broiler hatching eggs. *Poult. Sci.* 85: 1498-1501.
- Ernst RA, Bradley FA, Abbott UK, Craig RM, 2004. Egg candling and breakout analysis. ANR Publication 8134. <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8134.pdf>
- García Martín E, 2003. Reproducción de la perdiz roja y la codorniz. En: Reproducción e incubación en Avicultura. Ed. Real Escuela de Avicultura. Arenys de Mar (Barcelona), pp. 457-495.
- González-Redondo P, 2004. Un caso de cambio en el manejo de los recursos cinéticos: la historia de la cría en cautividad de la perdiz roja en España. *Rev. Esp. Estud. Agrosoc. Pesq.* 204: 179-203.
- González-Redondo P, 2006. Influence of the laying date on the fertility and hatchability of Red-legged partridge (*Alectoris rufa*) eggs. *J. Appl. Poult. Res.* 15: 579-583.
- Martínez-Alesón R, 2003. Manejo de la sala de incubación. En: Reproducción e incubación en Avicultura. Ed. Real Escuela de Avicultura. Arenys de Mar (Barcelona), pp. 291-314.
- Muriel A, Serrano A, 2007. Análisis de la fertilidad y determinación de la mortalidad embrionaria en huevos de gallinas de guinea. *ITEA Sp. Iss.* 1: 69-71.
- New DAT, 1957. A critical period for the turning of hens' eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 5: 293-299.
- Paci G, Marzoni M, Benvenuti N, Bagliacca M, 1992. Breeding technology of red-partridges: colonies or couples. 19th World's Poultry Con-

- gress, Amsterdam, Netherlands, vol. 3 pp. 351-352.
- Pérez y Pérez F, 1981. La perdiz roja española. Ed. Científico-Médica. Barcelona.
- Sánchez García-Abad C, Alonso ME, Prieto R, González V, Gaudioso VR, 2009. Una visión sobre la avicultura para la producción de caza en España. ITEA 105: 169-183.
- Setién M, 1991. Producción cinegética: granjas de perdices. En: Manual de Ordenación y gestión cinegética. Ed. IFEBA. Badajoz, pp. 133-152.
- SPSS Inc, 2006. Manual del Usuario de SPSS Base 15.0. SPSS Inc. Chicago, EE.UU.

(Aceptado para publicación el 27 de mayo de 2009)

Aspectos epidemiológicos de la neosporosis bovina en el Nordeste español. Una perspectiva clínica

S. Almería de la Merced^{*,**,¹}, F. López-Gatius^{***}

* Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

** Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

*** Departamento de Producción Animal, Universidad de Lleida, E.T.S.E.A., Avda. Rovira Roure 177, 25198 Lleida, España

Resumen

El parásito protozoo intracelular *Neospora caninum* ha sido descrito en un amplio rango de especies animales y se considera una de las causas más importantes de aborto en ganado vacuno en todo el mundo. En España, la seroprevalencia individual en las explotaciones y la tasa de infección en fetos abortados es elevada. Revisamos aquí aspectos epidemiológicos de la neosporosis en explotaciones de ganado vacuno lechero de alta producción en el Nordeste español. Es interesante resaltar que independientemente de la seroprevalencia de *N. caninum* a nivel de explotación, la titulación de los anticuerpos frente el parásito es un buen indicador del riesgo de aborto, que la seropositividad frente *N. caninum* es muy estable a lo largo del tiempo, de manera que las vacas crónicamente infectadas presentan un alta tasa de abortos repetitivos, y que la infección por *N. caninum* no afecta a la fertilidad de las vacas infectadas ni compromete la gestación durante el primer trimestre de la misma. El uso de semen de vacuno de carne en la inseminación artificial de vacas seropositivas, especialmente el semen de la raza Limusín, reduce drásticamente la incidencia de abortos. En las explotaciones en las que esta estrategia ha sido incluida como medida de control de la neosporosis, las tasas de aborto se redujeron de manera significativa y, dado que no se mantienen las hijas de madres infectadas, también se redujeron de manera importante las tasas de prevalencia de la enfermedad.

Palabras clave: *Neospora caninum*, epidemiología, vacuno lechero, Nordeste España, revisión.

Summary

Epidemiological aspects of bovine neosporosis in north east Spain. A clinical perspective

Neospora caninum has been found to infect a wide range of animals and it has emerged as a very important cause of abortion in cattle worldwide. In Spain, high herd seroprevalence and high percentages of infected aborted fetuses have been observed. We revise here several epidemiological aspects of neosporosis based on our studies in high producing dairy herds in North-eastern Spain. Our results indicated a close relationship between mother seropositivity to *N. caninum* and abortion risk and that irrespective of the herd level of *Neospora*-seroprevalence, plasma antibody titration against *N. caninum* is a good indicator of risk of abortion; *Neospora*-infection does not affect fertility nor compromises the subsequent maintenance of gestation during the first trimester of gestation in ani-

1. E-mail: sonia.almeria@uab.cat. Tel: 93 581 2847, Fax: 93 581 2006

mals chronically infected prior to pregnancy; *Neospora*-seropositivity can be very stable throughout years so that chronically infected cows can show a high rate of repeat abortions; and that the use of beef semen, especially that derived from the Limousin bulls, reduces dramatically the incidence of abortions. The later approach has been included in the control measures for neosporosis in dairy herds with high prevalence of *N. caninum* and significantly reduced both abortion and seroprevalence levels in those herds.

Key words: *Neospora caninum*, epidemiology, dairy cattle, North-East Spain, review.

Introducción

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por *Neospora caninum*, protozoo intracelular obligado, formador de quistes tisulares. Descrita por primera vez en perros en 1984 (Bjerkås *et al.*, 1984), *N. caninum* ha sido identificado en una amplia variedad de animales de sangre caliente (ver revisión de Dubey *et al.*, 2007), pero primariamente es una enfermedad del ganado vacuno y del perro. Aunque es un parásito estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii*, no hay evidencia de que infecte a la especie humana (Dubey *et al.*, 2007). En ganado vacuno, tanto de leche como de carne, la neosporosis causa mortalidad neonatal y abortos siendo considerada en la actualidad como una de las principales causas de aborto en ganado vacuno de todo el mundo (Dubey *et al.*, 2007). El aborto es el principal síntoma clínico asociado a la neosporosis bovina, aunque también han sido descritos otros cuadros como alteraciones neuromusculares, incapacidad para levantarse y menor peso de los terneros al nacimiento (Dubey *et al.*, 2006). La infección por *N. caninum* también se ha asociado a tasas de reposición más elevadas, por tanto con un menor valor económico de las vacas desde un punto de vista reproductivo, y a la lógica reducción en la producción de leche en las explotaciones debida a los abortos (revisado Trees *et al.*, 1999).

En ganado vacuno la infección por *N. caninum* ha sido descrita a nivel mundial. En

España, tras la descripción de los primeros casos de aborto en ganado vacuno (Barberán *et al.*, 1997; Fondevila *et al.*, 1998) los estudios de seroprevalencia en diferentes regiones han puesto de manifiesto la amplia difusión de la infección (Quintanilla *et al.*, 1999; Mainar-Jaime *et al.*, 1999). En concreto, en un estudio reciente europeo, la seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en vacuno en España fue la más elevada, en comparación con Alemania, Holanda o Suecia, con prevalencias en nuestro país del 63% en vacuno lechero y del 46% en vacuno de carne (Bartels *et al.*, 2006). Igualmente, la prevalencia de infección observada en fetos abortados es muy elevada, con unas cifras desde el 32% al 57% de los fetos infectados, dependiendo de los criterios de diagnóstico (González *et al.*, 1999; Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2003).

En el presente trabajo, resultado de una serie de estudios realizados por nuestro equipo, se revisan los aspectos epidemiológicos y las implicaciones clínicas de la neosporosis bovina en explotaciones de ganado lechero de alta producción del Nordeste de España.

Ciclo y formas de transmisión

El ciclo de *N. caninum* es indirecto y existen tres estadios infectantes: taquizoitos, bradizoitos y ooquistes. Los dos primeros, taqui-

zoitos y bradizoitos, están en el interior de quistes y son los estadios intracelulares que aparecen en los hospedadores intermedios (HI), mientras que los ooquistes son los estadios excretados por los hospedadores definitivos (HD) que para ser infectantes deben esporular en el medio ambiente.

En los HI ocurre la fase asexual de multiplicación del parásito. Los **taquizoitos** se multiplican a gran velocidad en diversos órganos del hospedador durante la fase aguda de la infección. Son la fase más patógena, causan lisis celular por división activa en las células que los hospedan y son los responsables de la transmisión transplacentaria al feto en las hembras gestantes. Posteriormente, los taquizoitos se transforman en **bradizoitos**, que se multiplican de manera lenta en el interior de quistes y se asocian con la fase crónica de la infección (Dubey et al., 2007). Estos quistes se localizan principalmente en el sistema nervioso central, pero se han descrito también en el tejido muscular estriado (Peters et al., 2001). Tras el consumo por HD de quistes tisulares de HI, por ejemplo con la ingestión de una placenta o de un feto abortado de una vaca infectada, ocurre la fase sexual del parásito en los HD, con formación de **ooquistes** que se excretan por las heces y esporulan en el medio ambiente en unas 24 horas. Estos ooquistes son de muy pequeño tamaño (10-11 mm de diámetro) y pueden contaminar agua y alimentos constituyendo la fase infectante para los HI. Entre los HD confirmados se encuentra el perro (McAllister et al., 1998) y el coyote (Gondim et al., 2004a) y recientemente se han observado ooquistes en zorros (Wapenaar et al., 2006). Se sospecha que otros cánidos silvestres como los lobos puedan actuar también como HD (Gondim et al., 2004a).

En el ganado vacuno existen dos formas de transmisión: horizontal y vertical. La **transmisión horizontal** de la infección, **tam-**

bién denominada trasplacentaria exógena, es posible por la ingestión de ooquistes eliminados en las heces del HD, tras su esporulación en el medio ambiente, que contaminan el alimento (pastos y forrajes y alimentos almacenados) y el agua de bebida. Sin embargo, la principal vía de transmisión de la infección en las explotaciones es la **transmisión vertical, congénita, materno-fetal, o trasplacentaria endógena**. En los animales infectados de forma congénita, que nacen aparentemente sanos, se detectan anticuerpos frente a *Neospora* antes de la toma del calostro (Dubey et al., 2007).

Neospora caninum es uno de los organismos con mayor capacidad de transmisión vertical en el ganado vacuno. Hasta un 95% de los terneros pueden nacer infectados verticalmente en una misma explotación y el parásito puede pasar de la madre al feto durante varias generaciones (Revisado Dubey et al., 2007). La mayoría de los terneros nacidos de madres seropositivas, son clínicamente normales, pero las hembras infectadas serán positivas durante toda la vida, teniendo más probabilidades de aborto al llegar a adultas, contribuyendo al mantenimiento de la infección en las explotaciones. Por otro lado, los abortos y la infección en general pueden repetirse en un mismo animal.

La transmisión lactogénica, aunque se considera posible pues experimentalmente se ha logrado infectar terneros recién nacidos y se ha detectado DNA en leche y calostro (Moskwa et al., 2003 y 2007), no parece posible en condiciones naturales (Dijkstra et al., 2001). La transmisión por vía venérea es poco probable aunque se ha detectado DNA de *Neospora* en semen de toros (Ferre et al., 2005). A fecha de hoy no se ha demostrado la transmisión directa de vaca a vaca.

Posibilidad de ciclos silváticos de *N. caninum* en España

Muchos aspectos del ciclo de *N. caninum* son todavía desconocidos (Dubey *et al.*, 2006). En Norteamérica se ha confirmado la transmisión de *N. caninum* entre ciervos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y cánidos en un ciclo silvático (Gondim *et al.*, 2004b). Estos autores han demostrado que perros alimentados con cerebros de ciervos de cola blanca infectados de manera natural, eliminan ooquistes y por tanto son capaces de cerrar el ciclo, verificando la existencia de ciclos silváticos. La existencia de un ciclo similar en Europa no ha sido descrita hasta la fecha.

Estudios realizados en diferentes áreas de España han puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos en ciervos (*Cervus elaphus*), arruís (*Ammotragus lervia*), corzos (*Capreolus capreolus*) y en jabalíes (*Sus scrofa*), aunque en éstos de manera ocasional (Almería *et al.*, 2007). En carnívoros silvestres se han detectado anticuerpos en zorros (*Vulpes vulpes*), lobos (*Canis lupus*), lince ibérico (*Lynx pardinus*), gatos silvestres (*Felis silvestris*) y diferentes especies de mustélidos (*Meles meles*, *Martes foina*, *Martes martes* y *Mustela putorius*) (Sobrinho *et al.*, 2008), demostrando el contacto con el parásito en estas especies de la fauna silvestre en nuestro país.

Entre los rumiantes silvestres las prevalencias más elevadas de anticuerpos frente *N. caninum* fueron observadas en los ciervos (Almería *et al.*, 2007). Dada la abundancia de zorros, éstos podrían tener un papel relevante en la epidemiología de la neosporosis y de hecho han sido considerados un factor de riesgo para el ganado vacuno (Simpson *et al.*, 1997; Barling *et al.*, 2000). En Europa, la presencia de DNA de *N. caninum* ha sido demostrada en cerebro de zorros en Cataluña (Almería *et al.*, 2002) y en la República Checa (Hurková and Modrý, 2006). Los resultados observados tanto en rumiantes como

en carnívoros silvestres indican que la infección de *N. caninum* en España parece estar bastante localizada en ciertas zonas donde, sin embargo, puede alcanzar prevalencias moderadas a altas (Almería *et al.*, 2007; Sobrinho *et al.*, 2008). En concreto, en un reciente estudio en zorros en una zona de los Pirineos Catalanes se encontró una seroprevalencia muy elevada (Marco *et al.*, 2008). La incorporación de las especies silvestres en la epidemiología de la neosporosis complica el enfoque de control aislado en las explotaciones vacunas, poniendo de manifiesto la necesidad de tomar medidas de control que involucren a la fauna silvestre (Almería *et al.*, 2007).

Relación de la seropositividad frente *N. caninum* con el aborto y principales vías de transmisión del parásito en explotaciones de ganado vacuno lechero del Nordeste de España

Analizando todos los animales de una explotación, exceptuando los animales menores de 6 meses para evitar los anticuerpos debidos a la ingestión de anticuerpos calostrales procedentes de madres seropositivas, se evaluó la prevalencia de animales seropositivos y su relación con cuadros de aborto y las vías de transmisión fundamentales en explotaciones de alta producción lechera en Cataluña. La toma de muestras en las explotaciones se hizo coincidiendo con el muestreo anual para el control de brucelosis y otras enfermedades.

En un primer estudio retrospectivo llevado a cabo durante 12 meses en una explotación en la que la tasa de aborto alcanzó un 23,2% (38 abortos de 164 gestaciones diagnosticadas), se encontraron anticuerpos frente *N. caninum* en un 35,4% de las vacas (84 vacas seropositivas de 237) y el 44% de los animales seropositivos abortaron durante el periodo de 1 año (López-Gatius *et al.*,

2004a). La presencia de anticuerpos frente *N. caninum* fue la única variable incluida en el modelo de regresión logística en relación con el aborto. La infección por *N. caninum* aumentó la probabilidad de aborto en las vacas con un riesgo relativo de 12,2 veces ($P < 0.0001$) al de los animales no infectados. Los factores generalmente asociados con las pérdidas de la gestación en la zona (edad de las vacas y estación de la gestación) no tuvieron efecto en este brote de abortos. La principal vía de transmisión en la explotación fue la transmisión vertical, dado que no se encontraron diferencias relacionadas con la edad respecto a la seroprevalencia en el brote de abortos. Basada en la relación del estado serológico entre madres e hijas en la explotación, la infección congénita superó el 90%. En concreto el 90,6% de madres seropositivas tuvieron crías seropositivas y el 90,9% de los terneros de madres seropositivas fueron seropositivos (López-Gatius *et al.*, 2004a). De interés fue el hecho de que dos terneros seropositivos nacieron de vacas seronegativas, indicando un pequeño grado de transmisión horizontal (López-Gatius *et al.*, 2004a). La granja no había tenido perros en los siete años anteriores, pero cabe la posibilidad de que ocurriera algún tipo de contacto con cánidos silvestres.

En un estudio posterior, se compararon dos kits comerciales de ELISA (Herd check[®] anti-*Neospora*, IDDEX Laboratorios, Madrid, España y CIVTEST[®], HIPRA, Girona, España) en muestras de 6 explotaciones incluyendo un total de unos 3.400 animales mayores de 6 meses. Ambos kits presentaron un nivel de concordancia muy elevado, considerando la seropositividad en CIVTEST ≥ 6.0 (valor kappa medio de 0,94, 0,90-0,96) (López-Gatius *et al.*, 2004b). En un reciente estudio a nivel europeo estos dos kits fueron comparados junto a otros y mostraron alta sensibilidad y especificidad (Bartels *et al.*, 2006). En todas las explotaciones se observó una

altísima relación de los animales seropositivos con los cuadros de aborto, confirmados mediante detección de *N. caninum* en los fetos. Al igual que en la explotación del estudio anterior, en estas explotaciones se observó una baja tasa de seroconversión y de transmisión horizontal (López-Gatius *et al.*, 2004b) que aunque baja es importante en el mantenimiento de la infección en las explotaciones, dado que la transmisión vertical no es del 100% (Davison *et al.*, 1999).

Temporalidad del aborto durante la gestación

El aborto es el principal síntoma clínico asociado a la neosporosis bovina. Los abortos por *N. caninum* pueden tener lugar desde los tres meses de gestación hasta finales de gestación, aunque la mayoría de los abortos tienen lugar entre los 5-7 meses de gestación (Anderson *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1991; Wouda *et al.*, 1997; Hattel *et al.*, 1998) según hemos observado también en nuestros estudios (López-Gatius *et al.*, 2004a). Sin embargo, los efectos de la infección por el parásito en el primer trimestre, cuando es difícil tener acceso a fetos, no están completamente aclarados. Por ello, analizamos el efecto abortivo de *N. caninum* antes y después de los 90 días de gestación en 2.773 gestaciones, de ellas 419 en animales seropositivos antes de la gestación, procedentes de seis explotaciones (López-Gatius *et al.*, 2004b). Los resultados mostraron que la seropositividad frente *N. caninum* no fue un factor de riesgo para la pérdida de la gestación durante el primer trimestre de la misma, mientras que a partir de los 90 días de gestación fue la única variable involucrada en los abortos, incrementando el riesgo de aborto en 18,9 veces ($P < 0.0001$; 95% intervalo de confianza de 12,9 a 27,8), respecto a las vacas no infectadas. Estos resultados sugieren que en el caso de animales infectados crónicamente

por el parásito previamente a la gestación, la infección por *N. caninum* no se relaciona con los abortos durante el período fetal temprano pero sí tienen un enorme efecto abortivo tras los 90 días de gestación.

Abortos recurrentes en vacas infectadas por *N. caninum*

Los brotes de abortos asociados a *N. caninum* pueden ser el resultado de una infección puntual, por ejemplo debida a la ingestión de alimentos contaminados por ooquistes o, más frecuentemente, ocasionados por la reactivación del parásito en vacas crónicamente infectadas, que es lo habitual en nuestra zona. A diferencia de *T. gondii*, que estimula una respuesta inmune protectora tras un primer contacto con el parásito y la aparición de anticuerpos protectores, en *N. caninum* no se desarrolla tal respuesta protectora o lo hace en menor medida (Williams *et al.*, 2003). Los abortos y la infección en general pueden repetirse en un mismo animal, aunque en una menor proporción (Barr *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995). Dado que las vacas seropositivas que abortan tienen una mayor probabilidad de ser eliminadas de la explotación, es difícil evaluar si las vacas crónicamente infectadas mantienen el riesgo de aborto durante sucesivas lactaciones o si se hacen resistentes al parásito. En un estudio retrospectivo en el que se incluyeron datos de vacas seropositivas durante tres años consecutivos en la misma explotación, respecto del total de animales seropositivos el 36,8% de los abortos de la explotación y el 26,7% de los abortos en los animales que permanecieron los tres años en la misma, tuvieron lugar en animales que tenían un historial previo de aborto (Pabón *et al.*, 2007). Por tanto, nuestros resultados confirman que las vacas que han abortado una vez tienen un riesgo de aborto similar al de las vacas que no han abortado nunca y que dichos animales no

desarrollan una respuesta inmune protectora suficiente frente el aborto, de acuerdo con lo resultados de Thurmond y Hietala, (1997) y Corbellini *et al.* (2006). La eliminación de las vacas seropositivas que hayan sufrido dos o más abortos podría por tanto recomendarse para la reducción del aborto asociado a *N. caninum* en las explotaciones.

Efecto del estrés climático en vacas de alta producción lechera infectadas crónicamente por *N. caninum*

En dos explotaciones analizadas en nuestra zona de estudio observamos que un factor de riesgo en la presentación de abortos asociados a *N. caninum* fue la lluvia (López-Gatius *et al.*, 2005c). Se hipotetizó que la lluvia en zonas secas como el Nordeste de España, puede ser causa de estrés directo e indirecto a los animales (cambios a temperaturas más frías, cambios de comportamiento, cambios en la calidad de los alimentos, peor higiene...) que pueden desencadenar cuadros de aborto en animales crónicamente infectados con *N. caninum*. En un estudio reciente, igualmente se observó que un incremento en el número de días acumulados con humedad relativa superior al 60% en el segundo trimestre de gestación aumentó el riesgo de aborto tanto en vacas como en novillas y en el caso de las vacas el aumento de lluvia tuvo el mismo efecto (Yaniz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x). Los factores climáticos como la lluvia o las altas temperaturas parecen promover la esporulación de los ooquistes de *N. caninum* y su diseminación y por tanto, favorecer la transmisión postnatal. Otra explicación es que esas condiciones climáticas pueden favorecer el crecimiento de hongos y éstos y sus toxinas pueden ser causa de inmunosupresión en la vaca y a su vez favorecer la reactivación de infecciones de *N. caninum* en los animales crónicamente infectados (Dubey *et al.*, 2007).

El análisis serológico anual de las explotaciones puede ser un método efectivo y rápido de detectar animales infectados por *N. caninum* y que permite valorar el riesgo de aborto relacionado con la infección

Como se ha indicado anteriormente, en nuestros estudios se ha observado una relación muy clara entre la seropositividad a *N. caninum* y los cuadros de aborto, confirmada por la detección del parásito en fetos abortados. El riesgo relativo de aborto en las vacas seropositivas fue de entre 12-19 veces superior respecto de las seronegativas en las distintas explotaciones analizadas (López-Gatius *et al.*, 2004a, b). Similares resultados han sido observados en múltiples estudios en todo el mundo (revisado Dubey *et al.*, 2007). De interés es el hecho de que, independientemente del nivel de seroprevalencia alcanzado en cada explotación (seroprevalencias del 3 al 36%), las tasas de aborto registradas en los animales seropositivos fueron similares (30%) (tabla 1) (López-Gatius *et al.*, 2005a).

Por otro lado, cuando se consideraron los títulos y no sólo si los animales eran seropositivos, se observó también una relación significativa entre los títulos de anticuerpos y el aborto (una unidad de incremento en los títulos de anticuerpos a *Neospora* se relacionó con un incremento de 1,01 veces la tasa de aborto ($P = 0,004$) (Lopez Gatius *et al.*, 2005b). Varios estudios han relacionado los cuadros de aborto con los títulos de anticuerpos (Kashiwazaki *et al.*, 2004; Waldner, 2005). En estudios recientes en nuestra zona hemos observado que los abortos son significativamente menos frecuentes en los animales seropositivos que presentan bajos niveles de anticuerpos (< 30 unidades en CIVTEST) comparados con los de altos niveles (≥ 30 unidades CIVTEST) (Yániz *et al.*, en prensa, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x; Almería *et al.*, 2009a). Sin embargo, la titulación de anticuerpos frente a *N. caninum* no se pudo relacionar con una mayor o menor probabilidad de aborto cuando se incluyeron en el estudio los resultados obtenidos en las novillas (López-Gatius *et al.*, 2005c). Igualmente, en un estudio reciente

Tabla 1. Animales seropositivos frente *Neospora caninum* y tasas de aborto en tres explotaciones (A, B y C)^a

Table 1. *Neospora caninum* seropositive animals and abortion rates in 3 herds (A, B and C)^a

Explotación	N	Animales Seropositivos (%)	Animales Seropositivos que abortaron (%)	Animales Seronegativos que abortaron (%)
A	180	47 (26) ^b	18/64 (28) ^c	4/182 (2) ^d
B	440	123 (28) ^b	60/192 (31) ^c	21/646 (3) ^d
C	1350	60 (4) ^b	19/58 (33) ^c	68/1398 (5) ^d
Total	1970	230 (12) ^b	97/314 (30) ^c	93/2226 (4) ^d

^aBasados en análisis serológicos anuales frente *N. caninum* y en la confirmación de *N. caninum* en los fetos abortados

^bRespecto al número total de animales

^cRespecto al total de gestaciones en animales seropositivos

^dRespecto al total de gestaciones en animales seronegativos

Las tasas de aborto (c versus d) en los tres rebaños fueron significativas ($P < 0.0001$) en test χ^2 (López-Gatius *et al.*, 2005a)

(Yániz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x) se ha observado una probabilidad de aborto 3,2 veces menor en vacas con bajos niveles de anticuerpos frente *N. caninum* (6 a 29 unidades) comparadas con vacas con tasas elevadas de anticuerpos (≥ 30 unidades), mientras que en las novillas esta variable no presentó ningún efecto. Estos resultados parecen indicar que algunos factores que intervienen en los abortos por *N. caninum* son diferentes en novillas y en vacas probablemente relacionadas con primo-infección *versus* múltiples infecciones en estos animales (Yániz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x).

En animales infectados, la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* es estable a lo largo del tiempo

En el estudio retrospectivo en el que se incluyeron datos de vacas seropositivas durante tres años consecutivos en la misma explotación, se observó que los anticuerpos frente *N. caninum* permanecieron por encima del umbral de seropositividad a lo largo de esos años en la mayoría de los animales. De una prevalencia inicial del 18% en 122 animales, en el segundo año sólo se observó seroconversión en 4 animales, lo que incrementó la prevalencia al 21,3% que permaneció sin cambios en un tercer año (Pabón *et al.*, 2007). Similarmente, Hasler *et al.* (2006) observaron que sólo 2 de 30 animales seropositivos y 1 de 83 seronegativos cambiaron su estado serológico durante la gestación, indicando que en vacuno infectado crónicamente los anticuerpos presentan una pequeña inestabilidad transitoria. Estos resultados refuerzan la idea de que un análisis serológico anual es un método efectivo para el estudio de la prevalencia e infección por *N. caninum* en las explotaciones. Por todo ello, independientemente de la seroprevalencia frente *N. caninum* a nivel de explotación, la serología materna, incluyendo los títulos, puede ser un buen indi-

cador del aborto (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000; López-Gatius *et al.*, 2005b) y de utilidad en los programas de control reproductivo de las explotaciones.

Dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*

Algunos autores han indicado que los anticuerpos frente *N. caninum* sufren fluctuaciones a lo largo de la gestación (Quintanilla *et al.*, 2000). Cuando se estudió la dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación en 86 vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*, procedentes de 2 explotaciones en el Nordeste de España con infección confirmada en fetos, 21 de las cuales abortaron (Nogareda *et al.*, 2007), se observaron dos claros modelos en la dinámica de anticuerpos. Aproximadamente un 50% de los animales presentaron un aumento de anticuerpos en la segunda mitad de la gestación mientras el otro 50% no presentó dicho aumento y en los animales que abortaron también aproximadamente la mitad presentó un pico de anticuerpos alrededor del aborto mientras en otros animales este pico no fue evidente. Fluctuaciones en la seroprevalencia, entendida como aquellos animales con valores seronegativos en algún muestreo a lo largo de la gestación fueron observadas en 2 de las vacas que abortaron y en 11 de las no abortadas. El hecho de que algunos animales presentaran resultados negativos en el momento del aborto o del parto es de importancia diagnóstica, ya que muchas veces se envían los fetos abortados con la sangre materna y ésta puede resultar negativa (Nogareda *et al.*, 2007).

Dado que varias vacas que abortaron presentaron los máximos niveles de anticuerpos antes del aborto con un consistente aumento de anticuerpos a mediados de la gestación, el incremento de la respuesta humoral indicaría una reactivación de la

infección parasitaria más que una reinfección propiamente dicha en estos animales.

La infección por *N. caninum* no afecta la fertilidad de vacas de alta producción lechera

En explotaciones con alta incidencia de abortos asociados a *N. caninum* (30% de las vacas seropositivas) no se encontró un efecto de la infección sobre la fertilidad (López-Gatius *et al.*, 2005a). El porcentaje de vacas gestantes seronegativas (34%: 2.226/6.556) fue semejante al de las seropositivas (33%:314/962). Sí que afectaron factores ampliamente reconocidos como estación, explotación, número de lactación, toro y técnico inseminador. Estos datos indicarían que el aparato genital de la vaca infectada con *N. caninum* parece no quedar dañado de manera que la neosporosis no afecta la fertilidad.

Neospora caninum parece no afectar la función placentaria en las vacas infectadas que no abortan

La determinación de la concentración de glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG-1) en la sangre materna se ha empleado para el diagnóstico de gestación y como un marcador del bienestar placentario y fetal (Patel *et al.*, 1997; Zarrouk *et al.*, 1999). En un estudio reciente (López-Gatius *et al.*, 2007a), las concentraciones de PAG a lo largo de la gestación no presentaron diferencias en 13 animales crónicamente infectados que no abortaron comparados con 6 controles seronegativos, mientras que en 3 animales seropositivos que abortaron o presentaron fetos momificados los niveles de PAG fueron muy bajos o no detectables. Estos resultados parecen indicar que las concentraciones de PAG-1 son un buen indicador del estado feto-placentario en los animales que sufren aborto asociado a *N. caninum*, mientras que en las vacas con

infecciones crónicas que no abortan la infección parece no afectar la función placentaria. Resultados similares han sido observados en un estudio más amplio en el que se analizaron 89 animales gestantes (Serrano *et al.*, 2009). Las gestaciones gemelares, el uso del semen de Limusín en la inseminación artificial y si las gestaciones tenían lugar en el periodo cálido fueron factores que afectaron las concentraciones de PAG, pero no la seropositividad frente *N. caninum* o los títulos de anticuerpos frente al parásito.

El tratamiento con progesterona a partir del cuarto mes de gestación puede inducir aborto en vacas seropositivas con alta titulación a *N. caninum*

La respuesta inmune promovida por células y citoquinas denominadas Th1 es considerada protectora frente protozoos, incluyendo *N. caninum*. Sin embargo, durante la gestación hay una considerable inmunomodulación endocrina de la respuesta inmune, ya que una excesiva respuesta inmune de tipo celular podría estar relacionada con el aborto en vacas infectadas (revisado por Innes *et al.*, 2005). En la inmunomodulación natural de la gestación, la progesterona se ha relacionado con la reducción de la respuesta inmune celular Th1 (Druckmann y Druckmann, 2005). Por todo ello, se planteó la hipótesis de que la aplicación de un tratamiento con progesterona durante el segundo tercio de la gestación podría reducir la tasa de abortos. Se asignaron animales seropositivos frente *N. caninum* en un grupo Control (n = 33) y en un grupo Tratamiento (n = 34). El tratamiento consistió en la aplicación de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (1,55 g de progesterona) el día 120 de gestación durante 28 días. Se observó que las vacas con alta titulación tenían una probabilidad de aborto 14,3 veces más alta tras el tratamiento que las

que no recibieron tratamiento, mientras que en vacas con baja titulación el tratamiento con progesterona no tuvo efecto (figura 1). Estos resultados no soportaron la hipótesis previa establecida y sugieren que en vacas con alta titulación de anticuerpos frente a *N. caninum* el tratamiento con progesterona incrementa la tasa de abortos, posiblemente debido a una reducción excesiva de la respuesta inmune de tipo celular (Bech-Sàbat *et al.*, 2007).

Efecto protector de la producción de IFN- γ en la reducción del riesgo de aborto en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*

Dado que la suplementación con progesterona a mitad de gestación no disminuyó el riesgo de aborto en las explotaciones, una hipótesis complementaria fue que la producción de IFN- γ podría tener un papel en el mantenimiento de la gestación durante la infección

por *N. caninum*. Se analizó la producción de esta citoquina Th1, en 86 vacas seropositivas y en 40 seronegativas. Se observó producción en 16 (19%) de las vacas seropositivas pero no en las seronegativas (López-Gatius *et al.*, 2007b). De las 126 gestaciones 22 (17,5%) acabaron en aborto, que tuvo lugar en un 24,4% (21/86) de las vacas seropositivas y en un 2,5% de las seronegativas (1/40). El riesgo relativo de aborto fue 15,6 veces superior en las vacas seropositivas que no produjeron IFN- γ comparado con las seronegativas, mientras la neosporosis no tuvo ningún efecto en las seropositivas que produjeron IFN- γ (tabla 2). Por otro lado, se observó un efecto negativo ($P = 0.001$) de la producción de IFN- γ en el título de anticuerpos frente *N. caninum* en los 65 animales seropositivos que no abortaron. Estos resultados indican que la producción de IFN- γ está asociada con la protección frente el aborto causado por *N. caninum* en las vacas crónicamente infecta-

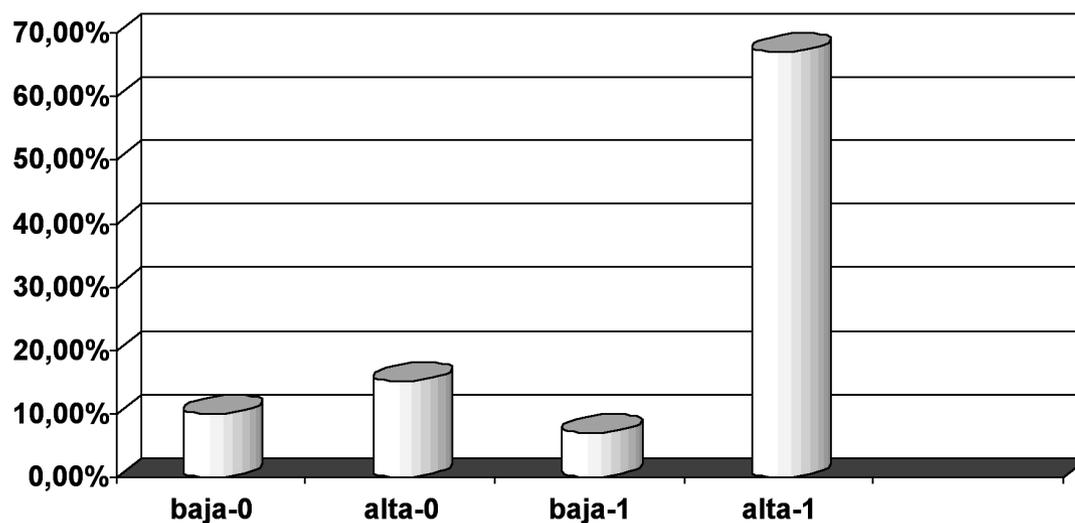


Figura 1. Tasas de aborto en animales con baja (< 30 unidades) o alta titulación (≥ 30 unidades) frente *N. caninum* antes del tratamiento (0-1) con progesterona a mediados de la gestación.
Figure 1. Abortion rates in animals with low (< 30 relative units) or high titres (≥ 30 relative units) against *N. caninum* before treatment (0-1) with progesterone at mid-gestation

Tabla 2. Efectos de la producción de IFN- γ en las tasas de aborto de vacas seropositivas a *Neospora caninum*

Table 2. Effects of IFN- γ production on abortion rates of *Neospora caninum* seropositive cows

Producción de IFN- γ	Seropositividad frente <i>N. caninum</i>	Tasa de aborto n	%	Odds ratio	95%IC ^a	P
Negativas	Seropositivas	20/70	28,6	15,6 ^b	2-121	0,009
Positivas	Seropositivas	1/16	6,3	2,6	0.2-44,6	0,51
Negativas	Seronegativas	1/40	2,5	Referencia		

^aIntervalo de Confianza

^bRiesgo relativo de que una vaca seropositiva a *N. caninum* sin producción de IFN- γ sufra aborto, comparada con una vaca seronegativa. (López-Gatius *et al.*, 2007b)

das y que las vacas que producen IFN- γ en algún momento de la gestación presentan niveles de anticuerpos más reducidos (López-Gatius *et al.*, 2007b).

Cuando se analizaron los isotipos de IgGs presentes (IgG1 e IgG2) en relación con la producción de IFN- γ (Almería *et al.*, 2009b), se observó un efecto negativo significativo en la producción de IgG1, mientras la producción de IFN- γ no afectó los niveles de IgG2. Por el contrario, se observaron mayores niveles de IgG2 comparado con IgG1 en los animales que abortaron, independientemente de que produjeran o no IFN- γ . Estos resultados parecen indicar que los anticuerpos IgG2 pueden ser parte de la respuesta protectora, pero sólo si van asociados a la producción de IFN- γ . Por si solos no son suficientes para proteger a las vacas crónicamente infectadas frente al aborto (Almería *et al.*, 2009b).

El efecto de la infección por *Neospora caninum* sobre la producción de leche

En un estudio reciente se registraron niveles plasmáticos de prolactina más altos en vacas seropositivas, en comparación de las seronegativas (García-Ispierto *et al.*, 2009), mientras que en otro estudio se constató que la glán-

dula mamaria tenía un aspecto más saludable y era más resistente a los agentes infecciosos en animales infectados que en los no infectados (Peregrine *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren, por una parte, un efecto protector de la prolactina frente a la enfermedad parasitaria, probablemente debido a su acción pro-inflamatoria (Brand *et al.*, 2004), y, por otra, un incremento de la respuesta inmune no específica frente a las infecciones de la glándula mamaria (Peregrine *et al.*, 2004). Por tanto, a pesar de que a nivel de explotación se reduce la producción de leche por el efecto negativo de la neosporosis en el ciclo reproductivo de la vaca (revisado Trees *et al.*, 1999), las vacas infectadas podrían producir más leche que las no infectadas (Pfeiffer *et al.*, 2002; García-Ispierto *et al.*, 2009).

El uso de semen de ganado vacuno de carne, especialmente de la raza Limusín, en la inseminación artificial de vacas crónicamente infectadas con *N. caninum* reduce el riesgo de aborto frente al parásito

Para reducir la prevalencia de infección por *N. caninum* en las explotaciones, especialmente en aquellas con tasas elevadas de seropositividad, dado que no existe tratamiento adecuado, se propuso la inseminación de los anima-

les seropositivos de los que no interesaba dejar descendencia en las explotaciones con semen de vacuno de carne. Cuando se aplicó esta medida de control, fue especialmente interesante el hecho que, además de reducir la prevalencia de infección en las explotaciones, la inseminación con semen de vacuno de carne disminuyó de manera drástica los abortos en las vacas seropositivas inseminadas (López-Gatius *et al.*, 2005b; Pabón *et al.*, 2007). En función del semen de toro utilizado, por ejemplo de las razas Limusín y Blanco Azul Belga, pudimos constatar un riesgo relativo 2,8 veces inferior en vacas seropositivas gestantes de razas cárnicas, cuando lo comparamos con animales gestantes de semen Frisón (Yaniz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x). Un estudio reciente más amplio, basado en un elevado número de animales (1.115 vacas seropositivas a *N. caninum* inseminadas), ha

confirmado estos resultados (Almería *et al.*, en prensa, doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.026). En este estudio el aborto tuvo lugar en un 15,2% (96/633) de las vacas seropositivas inseminadas con semen de vacuno de carne, en contraste con un 32,2% (155/482) de aborto en vacas inseminadas con semen de frisón. También se observaron diferencias en el riesgo de aborto con las diferentes razas cárnicas empleadas. Los porcentajes de aborto fueron del 32% de 482 vacas inseminadas con semen frisón, 22% de 49 vacas inseminadas con Charolés, 20% de 191 vacas inseminadas con semen de Blanco Azul Belga, 19% de 89 vacas inseminadas con semen de Piamontés y 10% de 304 vacas inseminadas con Limusín (Almería *et al.*, 2009a) (figura 2). El menor riesgo de aborto fue observado en las vacas seropositivas que presentaban bajos títulos de anticuerpos inseminados con semen de la raza Limusín, que

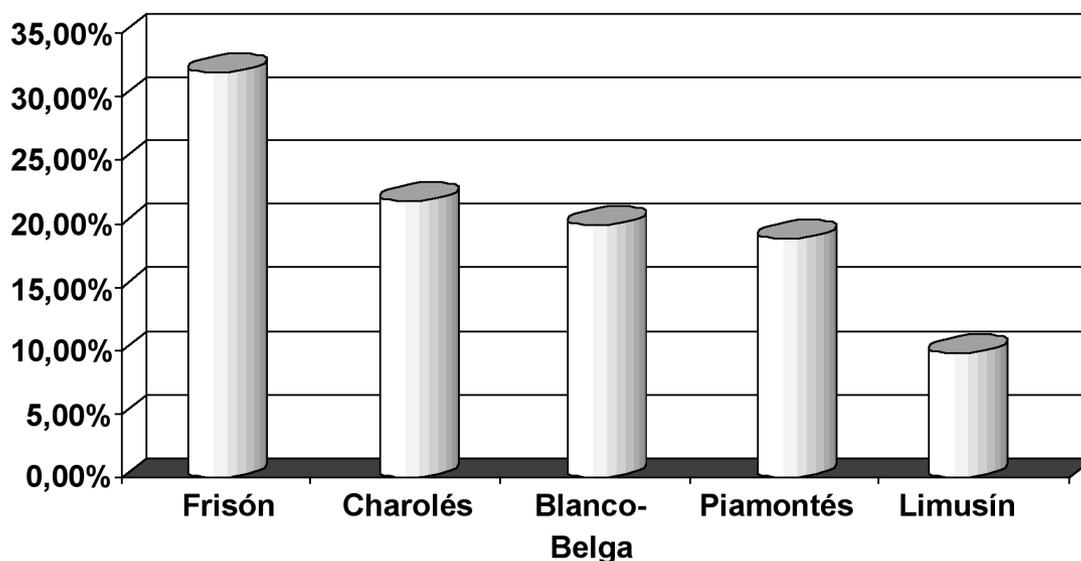


Figura 2. Tasas de aborto en vacas seropositivas inseminadas artificialmente con semen de diferentes razas (Frisón, Charolés, Blanco-Belga, Piamontés y Limusín)

Figure 2. Abortion rates of seropositive cows artificially inseminated with semen of several breeds (Friesian, Charolais, Belgian-Blue, Piedmontese and Limousin)

presentaron tasas de aborto similares a las de las vacas seronegativas (2,1%, 3/145, y 3,2%, 239/7432, respectivamente).

El hecho de que las gestaciones cruzadas reduzcan el riesgo de aborto asociado a *N. caninum* podría estar ligado a un mayor bienestar placentario en dichos animales. Se ha observado que la gestación cruzada favorece la producción de PAG-1 durante el periodo de gestación. De hecho un estudio reciente ha demostrado que las vacas de raza frisona inseminadas con semen de Limusín presentan niveles de PAG-1 significativamente más elevados que las vacas con gestaciones frisonas puras (Serrano *et al.*, 2009). Dado que las PAG-1 parecen tener propiedades inmunosupresoras, al menos a nivel uterino (Wooding *et al.*, 2005), las concentraciones más elevadas de PAG-1 pueden reflejar mecanismos para evitar el rechazo materno durante la gestación y compensar la distancia genética que existe con el feto en estas gestaciones cruzadas. Este mecanismo podría actuar reforzando la barrera placentaria e impidiendo el paso transplacentario de *N. caninum* y la infección del feto.

Por otro lado, nuestros resultados indican que ciertas razas, en concreto la raza Limusín, son menos susceptibles a la infección por *N. caninum* que otras. En un estudio epidemiológico la raza Limusín presentó seroprevalencia 6,7 veces menor que otras razas de doble propósito o razas de carne en el mismo sistema de manejo extensivo (Armengol *et al.*, 2007). Por tanto, se recomienda el uso de semen Limusín en la IA de animales seropositivos en las explotaciones con alta seroprevalencia frente *N. caninum*.

Estrategias de control de la neosporosis bovina

Como medidas de control de la enfermedad en las explotaciones de ganado vacuno en

las que las pérdidas económicas son importantes, dado que no hay un tratamiento eficaz, es fundamental prevenir la propagación de la infección, evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical y ello debe basarse en el control continuado de los animales positivos. El control serológico anual de todos los animales de una explotación con alta incidencia de abortos relacionados con *N. caninum* ayudará a reconocer los animales seropositivos y la titulación de los mismos frente al parásito. Se recomienda el control y la eliminación de los animales seropositivos con mayores títulos de anticuerpos de la explotación, especialmente si han tenido abortos previos. También es recomendable la inseminación de los animales seropositivos que se quieran mantener en la explotación con semen de toros de razas cárnicas, especialmente de la raza Limusín, para garantizar la eliminación de la descendencia de las vacas infectadas y reducir el nivel de seroprevalencia y los abortos asociados con *N. caninum*. Por supuesto, para que estas medidas tengan éxito a largo plazo deberán ir acompañadas de otras medidas, tales como evitar el acceso de perros y cánidos silvestres a las placetas y a las zonas de alimento. El control analítico de los animales que se van a introducir en la explotación deben ser también medidas esenciales preventivas y de control frente a esta enfermedad (Dubey *et al.*, 2007). Finalmente, en animales infectados valiosos, la transferencia de embriones a hembras seronegativas es una medida complementaria recomendada (Baillargeon *et al.*, 2001).

Agradecimientos

Estos trabajos han sido subvencionados por los proyectos CICYT: AGL2000-0904, AGL2004-06103 and AGL2007-65521.

Referencias

- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA, 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 198: 241-244.
- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H., et al., 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J. Am. Vet. Med. Assoc., 207: 1206-1210.
- Almería S, Ferrer D, Pabón M, Castellà J, Mañas S, 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. Vet. Parasitol., 107: 287-294.
- Almería S, Vidal D, Ferrer D, Pabón M, Fernández-de-Mera MI, Ruiz-Fons F, Alzaga V, Marco I, Calvete C, Lavin S, Gortazar C, López-Gatius F, Dubey JP, 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. Vet Parasitol., 143: 21-28.
- Almería S, Nogareda C, Santolaria P, García-Ispuerto I, Yániz JL, López-Gatius F, 2009b. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. Vet. Immunol. Immunopathol., 130: 35-42.
- Almería S, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G, Serrano, B, Santolaria P, Yániz JL, 2009a. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. Vet. Parasitol., 163: 323-329.
- Armengol R, Pabón M, Santolaria P, Cabezón O, Adelantado C, Yániz J, López-Gatius F, Almería S, 2007. Low seroprevalence of *Neospora caninum* infection associated with the Limusine breed in cow-calf herds in Andorra, Europe. J. Parasitol., 93: 1029-1032.
- Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauve R, 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 218: 1803-1806.
- Barberán M, Cebrián L, Gil J, 1997. Identificación de *Neospora* sp. en brotes de aborto en ganado bovino en Aragón. ITEA 18 II: 621-623.
- Barling KS, Sherman M, Peterson MJ, Thompson JA, McNeill JW, Craig TM, Adams LG, 2000. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc., 217: 1361-1365.
- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA, 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet. Pathol., 28: 110-116.
- Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, Chauvet AE, Dubey JP, Ardans AA, 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). J. Am Vet. Med. Assoc., 202: 113-117.
- Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Björkman C, Frössling J, von Blumröder D, Conraths FJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM, 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. Vet. Parasitol., 137: 17-27.
- Bech-Sàbat G, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Pabón M, Nogareda C, Yániz JL, Almería S, 2007. Progesterone supplementation during mid-gestation increases the risk of abortion in *Neospora*-infected dairy cows with high antibody titres. Vet. Parasitol., 145: 164-167.
- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J, 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd., 70: 271-274.
- Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, Luhm J, 2004. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. Eur. Cytokine Netw., 15: 99-104.

- Corbellini LG, Pescador CA, Frantz F, Wunder E, Steffen D, Smith DR, Driemeier D, 2006. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Vet. J.*, 172: 114-120.
- Davison HC, Otter A, Trees AJ, 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.*, 29: 1683-1689.
- Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW, 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 31: 747-752.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W, 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Path.*, 134: 267-89.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20: 323-367.
- Druckmann R, Druckmann MA, 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 97: 389-396.
- Ferre I, Aduriz G, del-Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernández E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM, 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63: 1504-1518.
- Fondevila D, Añor S, Pumarola M, Dubey JP, 1998. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. *Vet. Parasitol.*, 77: 187-190.
- García-Ispuerto I, López-Gatius F, Almería S, Yániz J, Santolaria P, Serrano B, Bech-Sabat G, Nogareda C, Sulon J, de Sousa NM, Beckers JF, 2009. Factors affecting plasma prolactin concentrations throughout gestation in high producing dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 36: 57-66.
- Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE, 2004a. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 34: 159-161.
- Gondim LFP, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME, 2004b. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J. Parasitol.*, 90: 1361-1365.
- Gonzalez L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco JC, Cuervo LA, 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet. Rec.*, 144: 145-150.
- Hattel AL, Castro MD, Gummo JD, Weinstock D, Reed JA, Dubey JP, 1998. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet. Parasitol.*, 74: 307-313.
- Häsler B, Hernandez JA, Reist M, Sager H, Steiner-Moret C, Staubli D, Stärk KD, Gottstein B, 2006. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Vet. Parasitol.*, 137: 222-230.
- Hurková L, Modrý D, 2006. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Vet. Parasitol.*, 137: 150-154.
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D, 2005. The host parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108: 29-36.
- Kashiwazaki Y, Giannechini RE, Lust M, Gil J, 2004. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, 120: 139-144.
- López-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K, Pabón M, Ferrer D, Almería S, 2004a. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.*, 51: 348-352.
- López-Gatius F, Pabón M, Almería S, 2004b. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 62: 606-613.

- López-Gatius F, Santolaria P, Almería S, 2005a. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. J. Vet. Med. B, 52: 51-53.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Almería S, 2005b. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. J. Vet. Med. B, 52: 88-92.
- López-Gatius F, García-Ispierto I, Santolaria P, Yániz JL, López-Béjar M, Nogareda C, Almería S, 2005c. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. J. Vet. Med. B, 52: 147-152.
- López-Gatius F, Garbayo JM, Santolaria P, Yániz JL, Almería S, Ayad A, de Sousa NM, Beckers JF, 2007a. Plasma pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) concentrations during gestation in *Neospora*-infected dairy cows. Theriogenology, 67: 502-508.
- López-Gatius F, Almería S, Donofrio G, Nogareda C, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Santolaria P, Yániz JL, Pabón M, de Sousa NM, Beckers JF, 2007b. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. Theriogenology, 68: 1067-1073.
- Mainar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, Hietala SK, 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. Vet. Rec., 145: 72-75.
- Marco I, Ferroglio E, López-Olvera JR, Montané J, Lavín S, 2008. High seroprevalence of *Neospora caninum* in the red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pyrenees (NE Spain). Vet. Parasitol., 152: 321-324.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM, 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol., 28: 1473-1478.
- Moskwa B, Cabaj W, Pastusiak K, Bien J, 2003. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. Acta Parasitol., 48: 138-141.
- Moskwa B, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W, 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. Parasitol. Res., 100: 633-636.
- Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Pabón M, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Yániz J, Almería S, 2007. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. Vet. Parasitol., 148: 193-199.
- Pabón M, López-Gatius F, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Nogareda C, Almería S, 2007. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. Vet. Parasitol., 147: 40-46.
- Patel OV, Sulon J, Beckers JF, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I, 1997. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. Eur. J. Endocrinol., 137: 423-428.
- Peregrine AS, Duffield TF, Wideman G, Kelton D, Hobson J, Cramer G, Hietala SK, 2004. Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. Prev. Vet. Med., 64: 101-112.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Alvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM, 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet. Parasitol., 111: 143-152.
- Peters M, Lutkefels E, Heckerroth AR, Schares G, 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. Int. J. Parasitol., 31: 1144-1148.
- Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtel JJ, Teague WR, 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. Prev. Vet. Med., 54: 11-24.
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Tabares E, Innes EA, González-Paniello R, Ortega-Mora LM, 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle and beef cattle in Spain. Int. J. Parasitol., 29: 1201-1208.

- Quintanilla-Gozaló A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora LM, 2000. Observational studies on *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.*, 30: 900-906.
- Serrano B, López-Gatius F, Santolaria P, Almería S, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Sulon J, de Sousa NM, Beckers JF, Yáñez JL, 2009. Factors Affecting Plasma Pregnancy-associated Glycoprotein 1 Concentrations Throughout Gestation in High-producing Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.* doi: 44: 600-605.
- Simpson VR, Monies RJ, Riley P, Cromey DS, 1997. Foxes and neosporosis. *Vet. Rec.*, 141: 308-9.
- Sobrino R, Dubey JP, Pabón M, Linarez N, Kwok OC, Millán J, Arnal MC, Luco DF, López-Gatius F, Thulliez P, Gortázar C, Almería S, 2008. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.*, 155: 190-197.
- Thurmond MC, Hietala SK, 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 58: 1381-1385.
- Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM, 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, 29: 1195-1200.
- Waldner CL, 2005. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 90: 219-242.
- Wapenaar W, Jenkins MC, O'Handley RM, Barckema HW, 2006. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *J. Parasitol.*, 92: 1270-1274.
- Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ, 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.*, 33: 1059-1065.
- Wooding FB, Roberts RM, Green JA, 2005. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: Possible functional implications. *Placenta*, 26: 807-827.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJ, van Knapen F, 1997. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9: 180-185.
- Yáñez JL, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Serrano B, Nogareda C, Sanchez-Nadal JA, Almería S, Santolaria P, 2009. The factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. *Reprod. Domestic Animals* (in press) doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x.
- Zarrouk A, Engeland I, Sulon J, Beckers JF, 1999. Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondii* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study. *Theriogenology*, 52: 1105-1114.

(Aceptado para publicación el 19 de junio de 2009).

Efecto de la estimulación eléctrica de la canal sobre la calidad de la carne de vacunos de pastoreo

J. Franco^{*,1}, G. Bianchi^{*}, O. Feed^{**}, G. Garibotto^{*}, F. Ballesteros^{***},
O. Bentancur^{****}, M. Carrere, J. Chiruchi^{*****}

* Departamento de Producción Animal y Pasturas. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni". (EEMAC) Ruta 3 km 363.500. Tel 005987241282 - Paysandú. C.P: 60000. Uruguay. E-mail: jufra@fagro.edu.uy

** Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay.

*** Departamento de Tecnología de Alimentos. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay.

**** Departamento de Estadística y Cómputos. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay.

***** Estudiantes en Tesis de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la estimulación eléctrica (80 V, 15 HZ, 30 s) de 34 canales de machos castrados Hereford (peso canal caliente $281 \pm 27,6$ Kg. promedio y desviación estándar) sobre la calidad de la carne. Las muestras fueron extraídas del músculo *Longissimus dorsi* (10^a costilla a 2^a vértebra lumbar), envasadas al vacío, maduradas 1, 3 y 7 días, cocinadas hasta una temperatura interna de 70° C, a baño María para el análisis de textura y en grill de doble plancha para el sensorial. El análisis sensorial se realizó con 140 consumidores, utilizando una escala discontinua y estructurada de 10 puntos. Las canales estimuladas presentaron valores de pH final inferiores a las controles (5,45 vs 5,60; $P < 0,05$) El color de la carne de las canales estimuladas fue superior en índice de rojo (a^*), índice de amarillo (b^*) y Chroma (C^*), e inferior en tono (H^*). La estimulación permitió obtener valores de WBSF inferiores a la carne de las canales controles (3,4 vs 4,0 kg, respectivamente; $P < 0,08$) y la carne madurada 7 días valores inferiores a la de 1 y 3 días, (3,1 vs 3,7 y 4,1 kg, respectivamente). La estimulación mejoró la terneza de la carne (6,12 vs 6,51); del mismo modo que al aumentar los tiempos de maduración (5,72 vs 6,33 vs 6,93, para 1, 3 y 7 días, respectivamente). La calidad del sabor y aceptabilidad aumentaron por efecto del tiempo de maduración, pero no por efecto de la estimulación eléctrica.

Palabras clave: bovinos, calidad de carne, estimulación eléctrica.

Summary

Effect of carcass electrical stimulation on meat quality of grazing cattle

The aim of this research was the study the effect of carcass electrical stimulation (80 V, 15 Hz, 30s) from 34 Hereford steers ($281 \pm 27, 6$ kg, means and standard deviation respectively) on meat quality. The samples were extracted from the *Longissimus dorsi* muscle (10th rib to 2nd lumbar vertebra), vacuum-packed and aged for 1, 3 and 7 days. They were cooked until a central heat temperature of 70 °C, in a

1. Autor para correspondencia

water bath for texture and grilled for sensory analysis. The sensory analysis was conducted with 140 consumers, using a 10 points discontinuous and structured scale. Stimulated carcass had lower pH values than controls (5.45 vs 5.6; $P < 0.05$). Meat color from carcasses stimulated were higher in red index (a^*), yellow index (b^*) and Chroma (C^*) and lower in hue (H^*) values in relation to control ones. Meat from stimulated carcasses achieved lower WBFS values than controls (3.4 kg vs 4.0 kg, $P < 0.08$) and meat aged from 7 days was more tender than those of 1 and 3 days (3.1 vs 3.7 kg and 4.1 kg respectively, $P < 0.05$). The electrical stimulation improved meat tenderness (6.12 vs. 6.51), together with the increasing ageing times (5.72 vs. 6.33 vs. 6.93, for 1, 3 and 7 days respectively). The quality of taste and acceptability rose for the effect of ageing time, but not for stimulation effect.

Key words: cattle, meat quality, electrical stimulation.

Introducción

La auditoria de calidad de carne vacuna realizada en Uruguay (INIA, INAC, CSU, 2003), señala la ocurrencia frecuente de problemas que conducen a la pérdida de valor de los productos cárnicos uruguayos, identificando a la variación en la terneza de la carne vacuna, como uno de los más importantes. La maduración de la carne a temperatura de refrigeración y envasada al vacío es un método eficaz para mejorar su terneza (Davey y Gilbert, 1969). Si bien el mecanismo por el cual se produce esta mejora en la terneza es aún discutido, existe consenso general en que la proteólisis de las proteínas miofibrilares es el factor que contribuye, en mayor medida, al proceso de mejora en la terneza durante la maduración *post-mórtem* (Koohmaraie, 1996). La carne que es congelada, detiene la actividad proteolítica de las enzimas musculares, responsables del efecto de la mejora de la terneza (maduración).

En nuestro país, del total de carne exportada, la carne enfriada y la congelada representan un 18% y un 82% respectivamente (INAC, 2007). Cross (1979), estima que el 50% de la energía necesaria para el procesamiento de la carne de vacuno, es atribuida al proceso de maduración. En el análisis de los costos de este proceso, éstos son atribuidos a la energía necesaria para conserva-

ción y a las pérdidas por evaporación que repercuten en el rendimiento de la canal.

Teniendo en cuenta el elevado costo del proceso de maduración, la industria congela la carne con destino exportación en un lapso de 48 a 96 horas post-faena, dependiendo de las exigencias de maduración de los distintos mercados, impidiendo, de esta forma, lograr los tiempos aconsejables de maduración para lograr niveles aceptables de terneza en la carne vacuna.

Además, existen variaciones importantes entre los distintos músculos con relación al tiempo de maduración necesario para alcanzar niveles aceptables de terneza (Franco et al., 2008), por lo cual, al congelar los distintos cortes a pocas horas de la faena, se produce una variación importante en la terneza de la carne.

Con el propósito de disminuir las pérdidas de peso y mantener una buena calidad microbiológica de la carne, la industria, generalmente, somete a las canales a una rápida velocidad de enfriado, aumentando el riesgo de la aparición de "acortamiento por frío", con la consecuente disminución en la terneza de la carne.

Este fenómeno conocido como "cold shortening" se produce por un rápido descenso de temperatura a menos de 10 grados, cuando el pH aun se encuentra en valores

superiores a 6. Esta situación sucede con mayor frecuencia en los músculos superficiales de la canal, y en aquellas canales de bajo peso y/o bajo espesor de grasa de cobertura.

En este sentido, para asegurar niveles aceptables de terneza en carne congelada, o en aquella enfriada cuyo destino es el consumo inmediato (períodos cortos de maduración), existen alternativas tecnológicas que –utilizadas– mejoran la actividad proteolítica y/o evitan el “acortamiento por frío” (Simmons et al., 2006).

La utilización de la técnica de estimulación eléctrica actuaría previniendo este problema, a través del uso de ATP antes del comienzo del rigor, acelerando la glicólisis anaerobia e incrementando la tasa de descenso de pH.

Es una alternativa de bajo costo y puede ser utilizada para mejorar la terneza y el color de la carne, principalmente en aquellas que necesariamente son sometidas a períodos cortos de maduración post - faena.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la técnica de estimulación eléctrica de bajo voltaje, en canales de machos castrados de la raza Hereford, sobre los principales parámetros de calidad instrumental y sensorial de la carne.

Material y métodos

El trabajo se realizó en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” de la Facultad de Agronomía, Paysandú, Uruguay (32,5° de latitud sur y 58,0° de longitud oeste).

Se utilizaron 32 machos castrados Hereford de 3 años de edad, pertenecientes al mismo rodeo y manejados en las mismas condiciones de pastoreo previo a la faena.

Los animales fueron estratificados por peso y condición corporal y asignados al azar a dos tratamientos durante el proceso de sacrificio en el matadero: 1) canales con estimulación eléctrica (EE) y 2) canales controles (C). La estimulación eléctrica de las canales se realizó dentro de los 5 minutos posteriores a la insensibilización, inmediatamente luego del degüello y durante el desangrado. Las características de la técnica utilizada fueron: bajo voltaje (80 V), frecuencia de pulsos 15 Hz, durante un tiempo de 30 segundos por animal. Luego del sacrificio se registró el peso de canal caliente.

En la tabla 1 se presentan las características descriptivas de la canal de los animales utilizados en el trabajo.

A las 24 h se determinó el peso canal fría y el pH final por medio de un pHmetro HANNA con electrodo de penetración sobre la superficie del músculo *Longissimus dorsi* a la altu-

Tabla 1. Peso vivo, peso canal, rendimiento canal y espesor de grasa del músculo *Longissimus dorsi* (MLD) de los animales experimentales
 Table 1. Live weight, carcass weight, carcass dressing and Longissimus dorsi fat thickness of experimental animals

	n	Media	Desviación Estándar
Peso sacrificio (kg)	32	540	46
Peso canal caliente (kg)	32	281	26,3
Rendimiento canal (%)	32	52	1,2
Espesor de grasa 10ª costilla MLD (mm)	32	9,8	3,1

ra de la 10ª costilla. Las determinaciones de los parámetros de color se realizaron luego de un período de una hora de exposición al oxígeno ("blooming"), por medio de un colorímetro Portátil MINOLTA CR 300. Se tomaron las determinaciones por triplicado de los 3 parámetros de color (L^* , a^* y b^*). El tono y croma se calcularon mediante las siguientes expresiones: $\text{Tono} = \arctan(b^*/a^*)$, $C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$ (Albertí et al., 2005). Posteriormente se extrajeron muestras ("bifes") del músculo *Longissimus dorsi* de 2,5 cm de espesor de la porción comprendida entre la 10ª costilla y 2ª vértebra lumbar, alternativamente sobre las medias canales izquierda y derecha para los análisis instrumentales y sensorial respectivamente. Estas muestras se envasaron al vacío y fueron enviadas a temperatura de refrigeración al Laboratorio de Calidad de Carne de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía. Parte de las muestras se congelaron inmediatamente a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ (1 día de maduración), en tanto que las demás muestras fueron mantenidas en cámara de refrigeración a $4\text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar los 3, y 7 días de maduración, para luego ser congeladas a $-18\text{ }^\circ\text{C}$, hasta su posterior análisis. Lo propio se realizó para el análisis sensorial. El análisis de textura se realizó descongelando las muestras en agua a temperatura ambiente, cocinándolas a baño María hasta una temperatura interna de $70\text{ }^\circ\text{C}$, sometiéndolas luego al corte con la cizalla de Warner – Bratzler (Beltrán y Roncalés, 2005). Para el análisis sensorial, las muestras del músculo *Longissimus dorsi* se descongelaron hasta alcanzar los $16,9 \pm 2,4\text{ }^\circ\text{C}$ y luego se procedió a la cocción en Grill de doble plancha hasta una temperatura interna en el centro de la muestra (limpia de restos evidentes de tejido conjuntivo o de las partes externas del filete) de $70\text{ }^\circ\text{C}$, controlada por termocuplas. Durante la cocción las muestras fueron envueltas en papel de aluminio y post-cocción, se cortó el "bife" en partes (tantas como consumido-

res/sesión) de forma prismática y en tamaño uniforme (10 - 30 g), y se sirvieron envueltas en papel de aluminio, calientes y codificadas con números aleatorios de 3 cifras (Guerrero, 2005). La escala utilizada fue del tipo discontinua y estructurada con una amplitud de 10 puntos, siendo 1: carne muy dura, muy desabrida o muy desagradable; 10: carne muy tierna, muy sabrosa o muy agradable, para los atributos: terneza, sabor y aceptabilidad, respectivamente. El panel estuvo conformado por 140 consumidores que trabajaron en 14 sesiones (10 consumidores/ sesión) de 1 h de duración. En cada sesión, balanceada por edad (edad promedio: $40 \pm 12,2$ años), se trabajó con personas de ambos sexos (50 mujeres y 90 hombres), y con los siguientes hábitos de consumo y grado de preferencia de carne vacuna: 60% consumían carne vacuna 4 o más veces al mes y 90% manifestó que le apetecía mucho. Cada consumidor probó 2 muestras de cada uno de los 6 tratamientos evaluados, presentándose éstas en dos platos consecutivos y alterando el orden de presentación de las muestras entre platos y entre consumidores, resultando en un diseño en bloques completo (todos los tratamientos en el mismo plato) y balanceado (cada combinación de pares de tratamientos se evaluó el mismo número de veces: 2). De esta forma, los consumidores evaluaron un total de 140 muestras en 28 platos de 5 muestras cada uno.

Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar, donde los bloques estuvieron representados por cada animal. La textura se analizó mediante análisis de varianza donde se evaluó el efecto bloque (animal) y el efecto del tiempo de maduración. Para la estimación de los efectos se utilizó el método de mínimos cuadrados provisto por el procedimiento GLM del paquete

estadístico SAS versión 9.1.3 (SAS, Institute, Inc., 2005). Para el análisis sensorial se utilizó un modelo lineal generalizado, asumiendo que se trataba de variables subjetivas con distribución multinomial, incluyendo como efectos: consumidor, plato, orden de la muestra anidado a plato y tiempo de maduración. Se utilizó el procedimiento GENOM del paquete estadístico SAS versión 9,1, 3 (SAS, Institute, Inc., 2005) y el test de Tukey para la comparación de medias.

Resultados

Peso canal

Una variable que es importante analizar cuando se utilizan alternativas tecnológicas durante el proceso de faena, es cuantificar las pérdidas de peso canal que puedan ocurrir en las primeras 24 horas como consecuencia de su aplicación.

Las pérdidas de peso canal por efecto de la EE no fueron significativas (4,9 vs 5,2 kg, $P > 0,10$), para las canales C y EE respectivamente.

Características instrumentales de la carne

En la tabla 2 se presentan los resultados de pH y color de los tratamientos evaluados.

Las canales estimuladas presentaron valores de pH final más bajo que los controles a las 24 horas de la faena, presentando ambos tratamientos valores que se corresponden con el rango de pH aceptables (Barros y Castro, 2004). Los valores de los parámetros de color analizados fueron superiores en los animales con EE, a excepción de la luminosidad que, sin alcanzar diferencias significativas, también mostró una tendencia a una mejora por efecto de la EE ($P = 0,12$)

En la tabla 3 se presentan los resultados de fuerza de corte (WBSF) para los tratamientos y períodos de maduración analizados.

No se evidenció interacción entre el efecto de la EE y los tiempos de maduración analizados. No obstante, por la sola aplicación de EE se lograron valores de fuerza de corte en carne madurada 24 horas, equivalentes a aquellas maduras durante 7 días sin EE.

La aplicación de EE redujo la WBSF en un 15% respecto de las canales controles. Por su parte, el efecto de la maduración se evidenció a los 7 días, con un 16% de disminución en la fuerza de corte entre el día 1 y 7 de maduración.

Características sensoriales de la carne

En el análisis sensorial tampoco se encontró interacción de la aplicación de EE con los tiempos de maduración analizados.

Tabla 2. pH y parámetros de color del músculo *Longissimus dorsi* a las 24 horas *postmortem* según los tratamientos evaluados (C = control y EE = Estimulación eléctrica)

Table 2. pH and *Longissimus dorsi* color parameters at 24 hours *postmortem* in relation to evaluated treatments (C = control and EE = Electric stimulation)

	pH 24	L*	a*	b*	Tono	Croma
C	5,59 ± 0,01a	38,5 ± 0,30a	13,5 ± 0,46a	11,1 ± 0,23a	39,6 ± 0,54a	17,5 ± 0,48a
EE	5,46 ± 0,01b	39,2 ± 0,31a	16,9 ± 0,47b	12,6 ± 0,24b	36,8 ± 0,56b	21,1 ± 0,49b

L* = luminosidad, a* = índice de rojo, b* = índice de amarillo. (a, b): Medias seguidas por distinta letra en la misma columna, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,10$).

Tabla 3. Valores de fuerza de corte (WBSF) para los tratamientos y períodos de maduración analizados.
Media y DE

*Table 3. Warner Bratzler shear force values in relation to treatments and ageing periods analyzed.
Media and DE*

Tiempo maduración	Estimulación eléctrica		
	Control	Tratado (EE)	Promedio
1 día	4,1 ± 0,25	3,4 ± 0,26	3,7 ± 0,18 a
3 días	4,3 ± 0,25	3,9 0 ± 0,26	4,1 ± 0,18 a
7 días	3,4 ± 0,25	2,8 ± 0,26	3,1 ± 0,18 b
Promedio	4,0 ± 0,22 A	3,4 ± 0,22 B	

(a, b): Medias seguidas por distinta letra en diferente fila, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,10$).

(A, B): Medias seguidas por distinta letra en diferente columna, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,10$).

El panel de consumidores detectó diferencias en las valoraciones de ternura, a partir de 3 días de maduración mostrando una mayor sensibilidad de esta prueba, frente a la valoración instrumental realizada por la cizalla de Warner Bratzler (tabla 4).

Por otra parte, la carne con EE fue catalogada como más tierna, frente a la de los animales controles.

En la tabla 5 y tabla 6 se presentan las notas de calidad de sabor y aceptabilidad general

del producto asignadas por el panel de consumidores a la carne de los diferentes tratamientos bajo estudio.

En los demás parámetros de la evaluación sensorial, calidad de sabor y aceptabilidad general, los resultados muestran un efecto significativo y favorable conforme transcurre la maduración, pero no del tratamiento de EE. A los 3 días de maduración la carne mejoró la calidad de sabor y aceptabilidad, alcanzando las mayores valoraciones del panel tras 7 días de maduración.

Tabla 4. Valores de ternura asignadas por panel de consumidores para los tratamientos evaluados.

Table 4. Tenderness values assigned by consumers panels in relation to evaluated treatments

Tiempo maduración	Estimulación eléctrica		
	Control	Tratado (EE)	Promedio
1 día	5,67	5,77	5,72a
3 días	6,06	6,59	6,33b
7 días	6,76	7,09	6,93c
Promedio	6,17A	6,5B	

(a, b): Medias seguidas por distinta letra en diferente fila, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,05$).

(A, B): Medias seguidas por distinta letra en diferente columna, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabla 5. Valores de calidad de sabor asignadas por panel de consumidores para los tratamientos evaluados

Table 5. Flavor values assigned by consumer's panels in relation to evaluated treatments

Tiempo maduración	Estimulación eléctrica		
	Control	Tratado (EE)	Promedio
1 día	6,44	6,35	6,39a
3 días	6,69	6,98	6,83b
7 días	6,93	7,00	7,01b
Promedio	6,69A	6,81A	

(a, b): Medias seguidas por distinta letra en diferente fila, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,10$).

(A, B): Medias seguidas por distinta letra en diferente columna, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,10$).

Tabla 6. Valores de Aceptabilidad asignadas por panel de consumidores para los tratamientos evaluados.

Table 6. Acceptability values assigned by consumer's panels in relation to evaluated treatments

Tiempo maduración	Estimulación eléctrica		
	Control	Tratado (EE)	Promedio
1 día	6,22	6,36	6,29a
3 días	6,55	6,95	6,75b
7 días	7,17	7,21	7,19c
Promedio	6,66A	6,85A	

a, b): Medias seguidas por distinta letra en diferente fila, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,10$).

(A, B): Medias seguidas por distinta letra en diferente columna, difieren estadísticamente por el test de Tukey ($P \leq 0,10$).

Discusión

La tendencia a una mayor pérdida de peso en las canales estimuladas, se explica porque la molécula de glucógeno es muy hidrofílica (3 - 4 g de H₂O/g de glucógeno), lo que contribuye a retener una cantidad considerable de agua en la estructura muscular (Warris, 1990). La rápida y mayor degradación de glucógeno por la EE hace que el glucógeno residual sea menor en las canales estimuladas y –por ende– menor cantidad de agua, con la consiguiente pérdida de peso.

Los valores inferiores de pH final de la carne por efecto de la EE se explican por una mayor tasa glicolítica en los animales con EE, resultando en una mayor acumulación de lactato con la consecuente disminución del pH (Kondos y Taylor, 1987). Estos resultados son coincidentes con los de Boston *et al.* (1980) y Miller *et al.* (1987), donde los tratamientos de EE, de bajo voltaje, mostraron un mayor descenso en los valores de pH a las 24 horas, respecto a los tratamientos controles. Sin embargo, Harwrysh *et al.* (1987) y Koh *et al.* (1987), reportaron que, por la

aplicación de EE se encontró una mayor tasa de descenso del pH en la primeras 24 horas *post-mórtem*, pero sin modificar los valores de pH final; situación que permitiría una mayor velocidad de enfriado de la canales, evitando el acortamiento por frío.

En el presente trabajo, la utilización de EE de bajo voltaje, arrojó como resultado un mejor color de la carne, mostrando las canales tratadas una carne más roja (a^*), con mayor intensidad de color (croma) y con niveles mas bajos de tono.

Cuanto mayor es el descenso en el pH, se produce una mayor desnaturalización de proteínas, determinando una estructura muscular más "abierta", mayor liberación de agua que se encuentra "ligada", permitiendo un color más pálido, situación que explicaría la tendencia a una ligera mayor luminosidad encontrada en las canales EE. Además estas condiciones facilitarían una mayor oxigenación de la mioglobina, lo que genera una mayor intensidad de rojo (a^*) y de amarillo (b^*), dando como resultado un mayor croma y un menor tono.

Page et al. (2001), encontraron una correlación negativa entre los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) y el pH a las 24 horas. Por su parte, Wulf y Wise, (1999), reportaron valores de correlación más altos entre a^* y b^* , con el pH, que la magnitud del parámetro de luminosidad (L^*). De esta forma, las variaciones de pH final encontradas en el presente trabajo, podrían estar explicando la mejora significativa en las coordenadas a^* y b^* reportadas.

Roeber et al. (2000), trabajando con estimulación eléctrica, pero con distintos voltajes y tiempos de aplicación a la del presente experimento, encontraron que, en todos los tratamientos, se evidenciaba una mejora en los parámetros de L^* , a^* y b^* . Resultados similares fueron encontrados utilizando EE de alto voltaje, en donde la utilización de EE mejoró el color en muestras del músculo *Longissimus dorsi* (Savell et al., 1978).

Sin embargo otros resultados muestran una mejora en la luminosidad (L^*) sin modificar los valores de los demás parámetros del color de la carne (Mc Keith et al., 1981; Miller et al., 1987).

Respecto a los resultados del Croma, conforme y tal cual ha sido descrito, este parámetro caracterizó bien el cambio de color experimentado por la carne de las canales testigo, presentando éstas valores más bajos, y de mayor tono, frente a las estimuladas eléctricamente. (Mac Dougall, 1977; Lizaso, 1998),

Por su parte, la reducción de un 15% en la fuerza de corte por efecto de la EE, es coincidente con una síntesis de resultados citados por Stiffler et al. (1); sobre un total de 331 animales de distintos trabajos, con dietas y categorías diferentes, encontraron una mejora promedio de WBFS de un 21,6%, a la vez que una mejora en la puntuación por panel sensorial de un 19,7%.

De los trabajos revisados que analizaron la utilización de EE a lo largo de la maduración, Savell et al. (1978) y Martin et al. (1983), trabajando con EE de alto voltaje, encontraron respuestas mayores en carnes con maduraciones menores a los 8 días. Wheeler et al. (1990), reportaron interacción entre el efecto de la EE y los tiempos de maduración, señalando que la EE mejoraba la terneza sensorial y disminuía la fuerza de corte (WBFS), a tasas decrecientes, a medida que aumentaba el tiempo de maduración de 7 a 28 días. La bibliografía revisada a este respecto, sugeriría que la ausencia de interacción en este trabajo en particular, podría estar explicada porque los tiempos de maduración evaluados fueron inferiores a 7 días.

Los resultados obtenidos con el análisis sensorial, confirman la misma tendencia encontrada en el análisis instrumental, con un efecto más importante del tiempo de maduración ($P < 0,001$), frente a la EE ($P < 0,05$), sin evidenciarse efectos de interacción

entre los tratamientos. La mayor sensibilidad de esta prueba, frente a la valoración instrumental realizada por la cizalla de Warner Bratzler, concuerda con lo señalado por Bianchi (2007), trabajando con carne ovina.

De los tres parámetros sensoriales evaluados, la utilización de EE mejoró la terneza de la carne, sin mostrar efectos significativos ($P > 0,10$) en calidad de sabor o aceptabilidad general de la carne.

Estos resultados son coincidentes con los de Crouse et al. (1983), Miller et al. (1987) y Wheeler et al. (1990), en los que la EE mejoró la terneza de muestras del músculo *Longissimus dorsi* con maduraciones de 7 días. Aunque todavía es discutido el mecanismo exacto por el cual actúa la EE mejorando la terneza de la carne, algunos autores sugieren que esta técnica previene el acortamiento por frío (Bendall, 1976), promueve la activación y liberación enzimática (Ferguson et al., 2000) y provoca la ruptura de las fibras musculares (Takahashi et al., 1984; Ho et al., 1986).

El tiempo de maduración es un componente fundamental en el desarrollo de los precursores del sabor de la carne (Ouali, 1996). En los experimentos de Campo et al. (1998) y Adelino (2002), los atributos de terneza, jugosidad, olor (intensidad global, olor a hígado y calidad del olor) y sabor (intensidad global de sabor, sabor ácido, sabor hígado, calidad de sabor), aumentaron conforme lo hizo la maduración, sugiriendo la necesidad de un período de maduración mínimo para mejorar la terneza y el desarrollo de los sabores característicos en la carne bovina. En este trabajo la calidad del sabor mejoró a partir de los 3 días de maduración, mientras que la aceptabilidad continuó mejorando las notas hasta los 7 días de maduración.

Los resultados del presente experimento indican que la utilización de EE de bajo voltaje a canales vacunas durante la faena, mejora el color y la terneza instrumental y

sensorial en carnes que se consumen o se congelan en períodos menores a 7 días. La maduración, de acuerdo a lo esperado, mejoró la terneza instrumental y todos los parámetros organolépticos calificados por el panel de consumidores.

Agradecimientos

A la Gerencia de Producción, al equipo técnico y a todo el personal de playa de faena y de sala de desosado del Frigorífico Tacuarembó (Grupo Marfrig) por proveer el material necesario y facilitar la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Albertí P, Panea B, Ripoll G, Sañudo C, Olleta JL, Hegueruela I, Campo MM, Serra X, 2005. Medición del color. En: *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes*. Monografías INIA: Serie ganadera. N° 3. pp. 216-225.
- Adelino ES, 2002. Influencia de la raza y del peso vivo al sacrificio sobre la evolución de la calidad de la carne bovina a lo largo de la maduración. *Tesis Doctoral*. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. España.
- Barros A, Castro L, 2004. Bienestar Animal. Buenas Prácticas Operacionales. *Serie Técnica 34*, junio de 2004. Instituto Nacional de Carnes (I.N.A.C.).
- Beltrán JA, Roncalés P, 2005. Determinación de la textura. En: *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes*. Monografías INIA: Serie ganadera. N° 3. Pp. 237-242.
- Bendall JR, 1976. Electrical stimulation of rabbit and lamb carcasses. *J. Sci. Food Agric.* 27, 819-826.

- Bianchi G, 2007. Identificación y cuantificación de factores que afectan la calidad de carne ovina Capítulo VII. En: *Alternativas tecnológicas para la producción de carne ovina de calidad en sistemas pastoriles*. Ed. Hemisferio Sur. pp. 227-283.
- Boston PA, Ford A, Harris P, Shaw F, 1980. Electrical Stimulation of beef sides. *Meat Sci.* 4, 145-156.
- Campo M, Sañudo C, Panea B, Albertí P, Santolaria P, 1998. Breed and ageing time effects on textural sensory characteristics of beef strip loin steaks. En: *Proceedings 44 th ICOMST*. pp. 898-899.
- Cross HR, 1979. Effects of electrical stimulation on meat tissue and muscle properties. A review. *J. Food Sci.* 44, 509-523.
- Crouse JD, Seideman SD, Cross HR, 1983. The effects of carcass electrical stimulation and cooler temperature on the quality and palatability of bull and steer beef. *J. Anim. Sci.* 56, 81-88.
- Davey GW, Gilbert KV, 1969. Studies in meat tenderness. Changes in the fine structure of meat during ageing. *J. Food Sci.* 34, 69-74.
- Franco J, Feed O, Bianchi G, Garibotto G, Ballesteros F, Nan F, Percovich M, Piriz M, Bentancur O, 2008. Parámetros de calidad de carne cinco músculos de novillos holando durante la maduración *post-mortem* III. Calidad sensorial. *Agrociencia.* 12, 74-79. Facultad de Agronomía. Montevideo. Uruguay.
- Fergusson DM, Jiang ST, Hearnshaw H, Rymill SR, Thompson JM, 2000. Effect of electrical stimulation on protease activity and tenderness of *M. longissimus* from cattle with different proportions of *Bos indicus* content. *Meat Sci.* 55, 265-272.
- Guerrero L, 2005. Análisis sensorial. En: *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes*. Monografías INIA: Serie ganadera. N° 3. pp. 397-422.
- Harwrysh JP, Shand P, Wolfe F, Price M, 1987. Studies of extra low voltage Electrical Stimulation of mature beef carcasses. *Meat Sci.* 21, 121-136.
- Ho CY, Stromer MH, Robson RM, 1986. Effect of electrical stimulation on postmortem titin, nebulin, desmin, and troponin- t degradation and ultrastructural changes in bovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 74, 1563-1575.
- INAC, 2007. *Anuario Estadístico de existencias, faena y exportación*. Instituto Nacional de Carnes. Dirección de Estudios e Investigación Económica. Montevideo. Uruguay.
- INIA, INAC, CSU, 2003. Auditoria de Calidad de la Carne Vacuna. "Un compromiso de mejora continua de la calidad de la carne vacuna del Uruguay". 23 p.
- Koh K, Bidner T, Mc Millin K, Hill G, 1987. Effects of Electrical Stimulation and temperature on Beef Quality and Tenderness. *Meat Sci.* 21, 189-202.
- Kondos A, Taylor D, 1987. Effect of Electrical Stimulation and temperature on Biochemical Changes in Beef Muscles. *Meat Sci.* 19, 207-216.
- Koohmaraie M, 1996. Biochemical factors regulation the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.* 43, 193-201.
- Lizaso G, 1998. Calidad de la carne de razas Pirenaica y Frizona. *Tesis Doctoral*. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. España.
- Mac Dougall D, 1977. Color in meat. En: *Sensory properties of foods*. (Ed) Brennan J. and K Parker Applied Science Publishers Ltd London. pp. 59-62.
- Martin A, Murray A, Jeremiah L, Dutson P, 1983. Electrical stimulation and carcass ageing effects on beef carcass in relation to post-mortem glycolytic rates. *J. Anim. Sci.* 57, 1456-1462.
- Mc Keith FK, Savell JW, Smith G, 1981. Tenderness improvement of the mayor muscles of beef carcass by electrical stimulation. *J. Food Sci.* 46, 1774-1779.
- Miller MH, Cross H, Buyck M, Crouse J, 1987. Bovine *Longissimus dorsi* muscle Glycogen and color response as affected by dietary regi-

- men and postmortem Electrical Stimulation in young bulls. *Meat Sci.* 19, 253-264.
- Ouali A, 1996. La maturation des viandes; facteurs biologiques et technologiques de variations. *Viandes et produit carnés* 11, 281-290.
- Page J, Wulf D, Schwotzer T, 2001. A survey of beef muscle color and pH. *J. Anim. Sci.* 79, 678-687.
- Roeber D, Cannell R, Belk K, Tatum J, Smith G, 2000. Effects of a unique application of electrical stimulation on tenderness, color, and quality attributes of the beef longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 78, 1504-1509.
- Savell JW, Smith GC, Carpenter ZL, 1978. Beef quality and palatability as affected by electrical stimulation and cooler ageing. *J. Food Sci.* 43, 1666-1672.
- SAS, 2005. Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, versión 9.1. 3 Carey, N.C.
- Simmons N, Daly C, Mudford C, Richards I, Jarvi G, Pleiter H, 2006. Integrated technologies to enhance meat quality. An Australasian perspective. *Meat Sci.* 74,172-179.
- Sttiffler D, Savel J, Smith G, Dutson T, Carpenter Z, 2008. Electrical Stimulation Purpose, Application and Results. <http://meat.tamu.edu/pdf/es.pdf>
- Takahashi G, Lochne J, Marsh B, 1984. Effects of low-frequency electrical stimulation on beef tenderness. *Meat Sci.* 11, 207-225.
- Wheeler TL, Savell JW, Cross HR, Lunt DK, Smith SB, 1990. Effects of postmortem treatments on the tenderness of meat from Hereford, Brahman and Brahman - Cross beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68, 3677-3687.
- Warris PD, 1990. The handling of cattle and its effects on carcass and meat quality. *Applied Behaviour Science* 28, 171-186.
- Wulf DM, Wise JW, 1999. Measuring muscle color on beef carcasses using L* a* b* color space. *J. Anim. Sci.* 77, 2418-2427.
- (Aceptado para publicación el 29 de junio de 2009).

**PREMIOS DE PRENSA AGRARIA 2009
DE LA
ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL
PARA EL DESARROLLO AGRARIO**

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

Los premios se regirán de acuerdo a las siguientes

BASES

1. Podrán concursar todos los artículos que versen sobre cualquier tema técnico-económico-agrario.
2. Los artículos que podrán acceder al premio serán todos aquellos que se publiquen en ITEA en el año 2008. Consecuentemente, los originales deberán ser enviados de acuerdo con las normas de ITEA y aprobados por su Comité de Redacción.
3. El jurado estará constituido por las siguientes personas:
 - a) Presidente de AIDA, que presidirá el jurado.
 - b) Director de la revista ITEA, que actuará de Secretario.
 - c) Director Gerente del CITA (Diputación General de Aragón).
 - d) Director del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.
 - e) Director de la Estación Experimental de Aula Dei.
4. El premio será anual y tendrá una dotación económica.
5. Las deliberaciones del jurado serán secretas, y su fallo inapelable.
6. El fallo del jurado se dará a conocer en la revista ITEA, y la entrega del premio se realizará con motivo de la celebración de las Jornadas de Estudio de AIDA.



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

CIHEAM/IAMZ - Cursos 2008-09-10

CIHEAM

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
PRODUCCIÓN VEGETAL	*MEJORA GENÉTICA VEGETAL	29 Sep. 08/5 Jun. 09	Zaragoza	IAMZ/UdL
	GESTIÓN DE RIESGOS EN LA AGRICULTURA MEDITERRÁNEA: SEGUROS AGRARIOS	24-28 Nov. 08	Zaragoza	IAMZ/MARM-ENESA
	*OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA INIA/IAMZ	28 Sep. 09/31 Mayo 10	Córdoba	UCO/JA/CSIC/COI/
	SALINIDAD DE SUELOS EN LOS SISTEMAS AGRARIOS: IMPACTO Y GESTIÓN	26-31 Oct. 09	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto Qualiwater
	ALIMENTOS FUNCIONALES: BASES CIENTÍFICAS Y OPORTUNIDADES PARA EL SECTOR AGROALIMENTARIO	15-19 Feb. 10	Zaragoza	IAMZ
	APLICACIONES DE LA BIOINFORMÁTICA EN MEJORA VEGETAL	12-16 Abr. 10	Zaragoza	IAMZ
PRODUCCIÓN ANIMAL	MÉTODOS ESTADÍSTICOS EN GENÓMICA ANIMAL	15-19 Sep. 08	Zaragoza	IAMZ
	EVALUACIÓN Y ANÁLISIS PROSPECTIVO DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE RUMIANTES	23-27 Feb. 09	Zaragoza	IAMZ
	CONTROL Y ERRADICACIÓN DE ENFERMEDADES ANIMALES REPRESENTATIVAS EN EL MEDITERRÁNEO	30 Mar./3 Abr. 09	Zaragoza	IAMZ/OIE/FAO
	PRODUCCIÓN ANIMAL Y GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	25-30 Mayo 09	Zaragoza	IAMZ
	*NUTRICIÓN ANIMAL	5 Oct. 09/11 Jun. 10	Zaragoza	IAMZ/UZ/FEDNA/UPM
	*MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	5 Oct. 09/30 Jun. 10	Valencia/ Barcelona	UPV/UAB/IAMZ/ IVIA/INIA/IRTA/ AGROALIMED

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

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - MEJORA GENÉTICA VEGETAL: 08-09; 10-11; 12-13 - OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA: 09-10; 11-12; 13-14 - NUTRICIÓN ANIMAL: 09-10; 11-12; 13-14 - MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN: 09-10; 11-12; 13-14 | <ul style="list-style-type: none"> - PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE: 08-09; 10-11; 12-13 - MARKETING AGROALIMENTARIO: 09-10; 11-12; 13-14 - ACUICULTURA: 08-09; 10-11; 12-13 - ECONOMÍA Y GESTIÓN DE LA ACTIVIDAD PESQUERA: 08-09; 10-11; 12-13 |
|--|---|

Se destinan primordialmente a titulados superiores en vías de especialización de posgrado. No obstante se estructuran en unidades independientes para facilitar la asistencia de profesionales interesados en aspectos parciales del programa. Los participantes que cumplan los requisitos académicos pueden optar a la realización del 2º año para la obtención del Título Master of Science. El plazo de inscripción para el curso de Olivicultura y elaiotecnica finaliza el 15 de Abril 2009. El plazo de inscripción para los cursos de Nutrición animal, Mejora genética animal y biotecnología de la reproducción y Marketing agroalimentario finaliza el 2 de Mayo 2009. El plazo de inscripción para los cursos de Mejora genética vegetal, Planificación integrada para el desarrollo rural y la gestión del medio ambiente, Acuicultura y Economía y gestión de la actividad pesquera finaliza el 2 de Mayo 2010. El Estado Español reconoce el título Master of Science del CIHEAM otorgado a través del IAMZ como equivalente al título oficial de Máster del sistema universitario español.

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

Becas. Los candidatos de países miembros del CIHEAM (Albania, Argelia, Egipto, España, Francia, Grecia, Italia, Líbano, Malta, Marruecos, Portugal, Túnez y Turquía) podrán solicitar becas que cubran los derechos de inscripción, así como becas que cubran los gastos de viaje y de estancia durante el curso. Los candidatos de otros países interesados en disponer de financiación deberán solicitarla directamente a otras instituciones nacionales o internacionales.

No obstante, en algunos cursos coorganizados con otras instituciones pueden existir becas destinadas a candidatos de algunos países no miembros del CIHEAM. Se recomienda consultar el correspondiente apartado de becas en el folleto informativo que se edita específicamente para cada uno de los cursos programados.

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
MEDIO AMBIENTE	*PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	29 Sep. 08/5 Jun. 09	Zaragoza	IAMZ/UdL
	ECONOMÍA AMBIENTAL Y DE LOS RECURSOS NATURALES	2-13 Feb. 09	Zaragoza	IAMZ
	EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA DESERTIFICACIÓN Y DE LA VULNERABILIDAD DE LOS SISTEMAS DE USO DEL SUELO	28 Sep./3 Oct. 09	Zaragoza	IAMZ/UE- Proyecto DeSurvey
	PREDICCIÓN DE LA DESERTIFICACIÓN A MEDIO PLAZO	18-23 Ene. 10	Zaragoza	IAMZ/UE- Proyecto DeSurvey
	ACUÍFEROS COSTEROS PARA RIEGO Y ABASTECIMIENTO: USO SOSTENIBLE Y ACTUACIONES DE REMEDIACIÓN	22-26 Mar. 10	Zaragoza	IAMZ
	GESTIÓN ADAPTATIVA DEL BOSQUE MEDITERRÁNEO EN UN CONTEXTO DE CAMBIO CLIMÁTICO: MITIGACIÓN DE IMPACTOS Y OPTIMIZACIÓN DE RECURSOS	10-14 Mayo 10	Zaragoza	IAMZ
COMERCIALIZACIÓN	MARKETING DE FRUTAS Y HORTALIZAS EN FRESCO	20-24 Oct. 08	Zaragoza	IAMZ
	DESARROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS	4-8 Mayo 09	Zaragoza	IAMZ
	*MARKETING AGROALIMENTARIO	5 Oct. 09/11 Jun. 10	Zaragoza	IAMZ
PESCA Y AGRICULTURA	*ACUICULTURA	31 Oct. 08/29 Mayo 09	Las Palmas de Gran Canaria	ULPGC/ICCM/IAMZ
	*ECONOMÍA Y GESTIÓN DE LA ACTIVIDAD PESQUERA	6 Oct. 08/30 Abr. 09	Barcelona	UB/MARM-SGM/IAMZ
	REPOBLACIÓN Y MEJORA DE STOCKS PESQUEROS	15-19 Dic. 08	Zaragoza	IAMZ
	GESTIÓN DE LA SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS DEL MAR BASADA EN EL ANÁLISIS DE RIESGOS	19-23 Ene. 09	Zaragoza	IAMZ/FAO
	METODOLOGÍAS DE EVALUACIÓN DE STOCKS DE PESCA EN EL MEDITERRÁNEO	16-20 Mar. 09	Zaragoza	IAMZ/CGPM
	USO DE LOS SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA PARA PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN EN PESCA Y ACUICULTURA	8-19 Jun. 09	Zaragoza	IAMZ/AECID/FAO
	ESTABLECIMIENTO Y GESTIÓN DE ÁREAS MARINAS PROTEGIDAS DE INTERÉS PESQUERO	8-13 Mar. 10	Zaragoza	IAMZ/MARM-SGM
	NUEVAS PERSPECTIVAS PARA LAS CADENAS DE COMERCIALIZACIÓN EN PESCA ARTESANAL	26-30 Abr. 10	Zaragoza	IAMZ/FAO
	MEJORAS TECNOLÓGICAS EN ARTES DE PESCA PARA UNA GESTIÓN SOSTENIBLE	14-18 Jun. 10	Zaragoza	IAMZ/AECID

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

Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza

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

INSCRIPCIÓN EN AIDA

* Si desea Ud. pertenecer a la Asociación, rellene la ficha de inscripción así como la carta para la domiciliación del pago de la cuota de asociado y envíelas a AIDA Avda. Montañana 930. 50059 Zaragoza.

El abajo firmante solicita su inscripción como miembro de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.

Apellidos..... Nombre.....
Dirección postal
Teléfono
Profesión..... Empresa de trabajo.....
Área en que desarrolla su actividad profesional

CUOTA ANUAL: Firma.

ITEA 40 €

FORMA DE PAGO:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Cargo a cuenta corriente o libreta | <input type="checkbox"/> Cargo a tarjeta |
| <input type="checkbox"/> Cheque bancario | <input type="checkbox"/> VISA |
| Tarjeta número: | <input type="checkbox"/> MASTERCARD |

□□□□□□□□□□□□□□□□

Fecha de caducidad: /

SR. DIRECTOR DE.....

Muy Sr. mío:

Ruego a Vd. se sirva adeudar en la cuenta cte./libreta n.º..... que matengo en esa oficina, el recibo anual que será presentado por la "Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario".

Atentamente,

Firmado:

BANCO O CAJA DE AHORROS:

SUCURSAL:

DIRECCIÓN CALLE/PLAZA: N.º

CÓDIGO POSTAL:

POBLACIÓN:

