

AIDA

Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Tomo I (2009)

XIII Jornadas sobre producción animal



www.aida-itea.org

**ASOCIACION
INTERPROFESIONAL PARA EL
DESARROLLO AGRARIO
(AIDA)**

XXXIX JORNADAS DE ESTUDIO

XIII JORNADAS

SOBRE PRODUCCION ANIMAL

12 y 13 de mayo de 2009

Zaragoza

TOMO I

COLABORAN:

Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad
Gobierno de Aragón: Departamento de Agricultura
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA)
Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (IAMZ)
Fundación Aula Dei, Parque Científico Tecnológico
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA)



Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Título:

XIII Jornadas sobre Producción Animal

Edita:

Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Textos:

Autores

Colección:

Congresos y Jornadas

Serie:

Producción Animal

Coordinadores:

Margalida Joy Torrens

Jorge H. Calvo Costa

Carlos Calvete Margolles

María Ángeles Latorre Górriz

Isabel Casasús Pueyo

Begoña Panea Doblao

Albina Sanz Pascua

Joaquín Balcells Teres

Foto portada:

José Antonio Rodríguez-Sánchez

XIII Jornadas sobre Producción Animal Tomo I	DIRECCION Y REDACCION Montañana, 930 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA (ESPAÑA)	ISBN: En tramitación Depósito legal: Z-1919-2009 INO Reproducciones, S.A. 50016 Zaragoza
--	--	---

**Prohibida toda reproducción total o parcial sin autorización expresa de la
Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario**

**AIDA no se solidariza necesariamente con las opiniones en los artículos firmados
que publica, cuya responsabilidad corresponde a los autores**

PATROCINADORES:



albéitar



PRÓLOGO

Una vez más, sed bienvenidos a las Jornadas sobre Producción Animal organizadas por AIDA. Esperamos y deseamos que vuestra estancia en Zaragoza sea fructífera y provechosa.

Como cada dos años, tendremos la oportunidad de intercambiar información y pareceres entre profesionales de la producción animal, lo que constituye el objetivo básico y fundamental del evento. En breve, tendremos el foro adecuado para presentar los últimos resultados de la investigación en producción animal y discutir futuros estudios que permitan encontrar respuestas a las inquietudes del sector ganadero.

Se confirma la tendencia de las anteriores ediciones: una presencia creciente de investigadores portugueses y sudamericanos y un gran número de trabajos multidisciplinares, lo que refuerza el valor de las Jornadas de reunir en un mismo foro a investigadores que trabajan y se interesan por todos los aspectos de la producción animal. En estas Jornadas se han consolidado muchos de los cambios que se introdujeron en ediciones anteriores y como novedad tenemos el jueves 14 de mayo una jornada satélite: *II Simposio sobre Metodologías aplicadas al estudio de la microbiología Digestiva*. Con ello se pretende unir los medios y esfuerzos para facilitar la participación de todos los interesados.

Deseamos aprovechar esta ocasión para mostrar nuestro más sincero reconocimiento al trabajo de todo el personal técnico de apoyo, tanto de campo como de laboratorio, sin cuya ayuda y participación en el desarrollo de las experiencias sería imposible obtener, presentar y discutir los resultados en estas Jornadas. También deseamos dedicar un especial agradecimiento a todos los participantes, por el esfuerzo que este año han tenido que realizar debido al gran número de Congresos y Seminarios, tanto nacionales como internacionales, que se están desarrollando en España durante el 2009.

Finalmente, queremos agradecer a todos los que de alguna manera han contribuido en la organización de las jornadas. Muy especialmente, a los secretarios de las distintas secciones, que han realizado un estupendo e intenso trabajo de revisión y organización; a los evaluadores y moderadores, por su inestimable colaboración; a D. Tomás García Azcárate, por su amabilidad al aceptar nuestra invitación para dar la conferencia inaugural; a Merche Ferruz, que está siempre donde y cuando hace falta; al IAMZ, por su siempre buena disposición y al resto de las instituciones y organismos que han colaborado en la organización o en la financiación. Las Jornadas nos permiten reencontrarnos con los amigos, a los que agradecemos siempre su presencia y colaboración.

Y, por supuesto, a todos los que con vuestra asistencia y trabajo hacéis posibles estas Jornadas.

MARGALIDA JOY TORRENS

Secretaria de las XIII Jornadas sobre Producción Animal

Acceso al IAMZ y al Campus de Aula Dei desde:

LOGROÑO

- Desde la A-68 tomar la A-2 dirección Lérida (Lleida)-Barcelona
- En la A-2 tomar la Salida 326 y al llegar a la bifurcación tomar la A-123 Montañana

MADRID

- Tomar la A-2 dirección Barcelona
- En la A-2 tomar la Salida 326 y al llegar a la bifurcación tomar la A-123 Montañana

VALENCIA

- En la A-23 tomar la Salida 276 A2 dirección Barcelona
- Seguir por la Z-40 hasta llegar a la Salida 15 Movera-Santa Isabel
- En Santa Isabel tomar la A-123 Montañana

CASTELLÓN

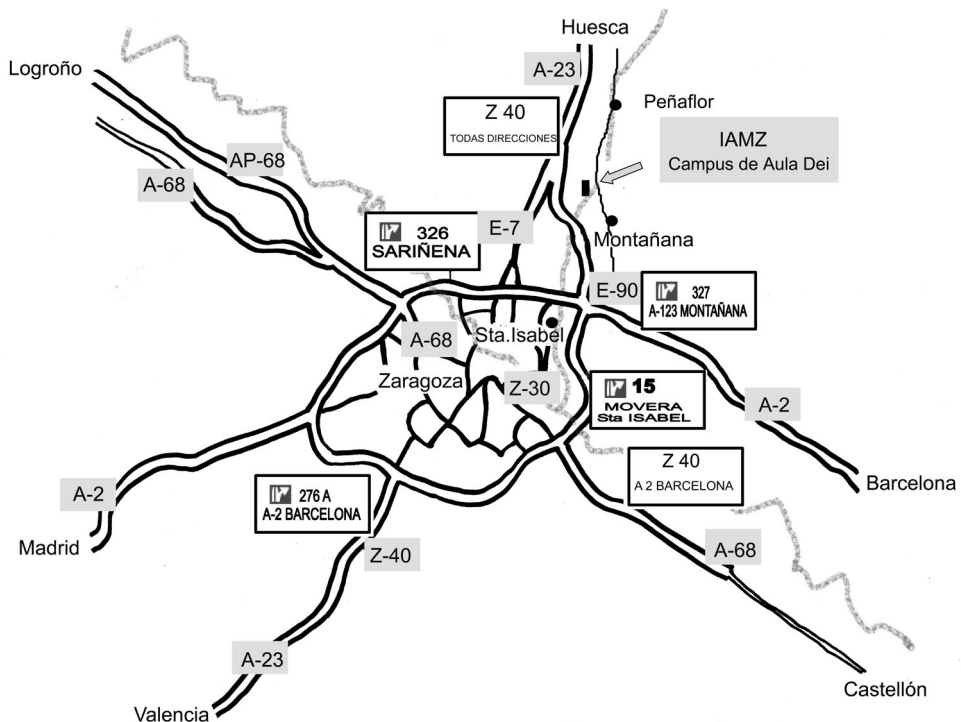
- En la A-68 tomar la dirección A-2 dirección Barcelona
- Seguir por la Z-40 hasta llegar a la Salida 15 Movera-Santa Isabel
- En Santa Isabel tomar la A-123 Montañana

BARCELONA

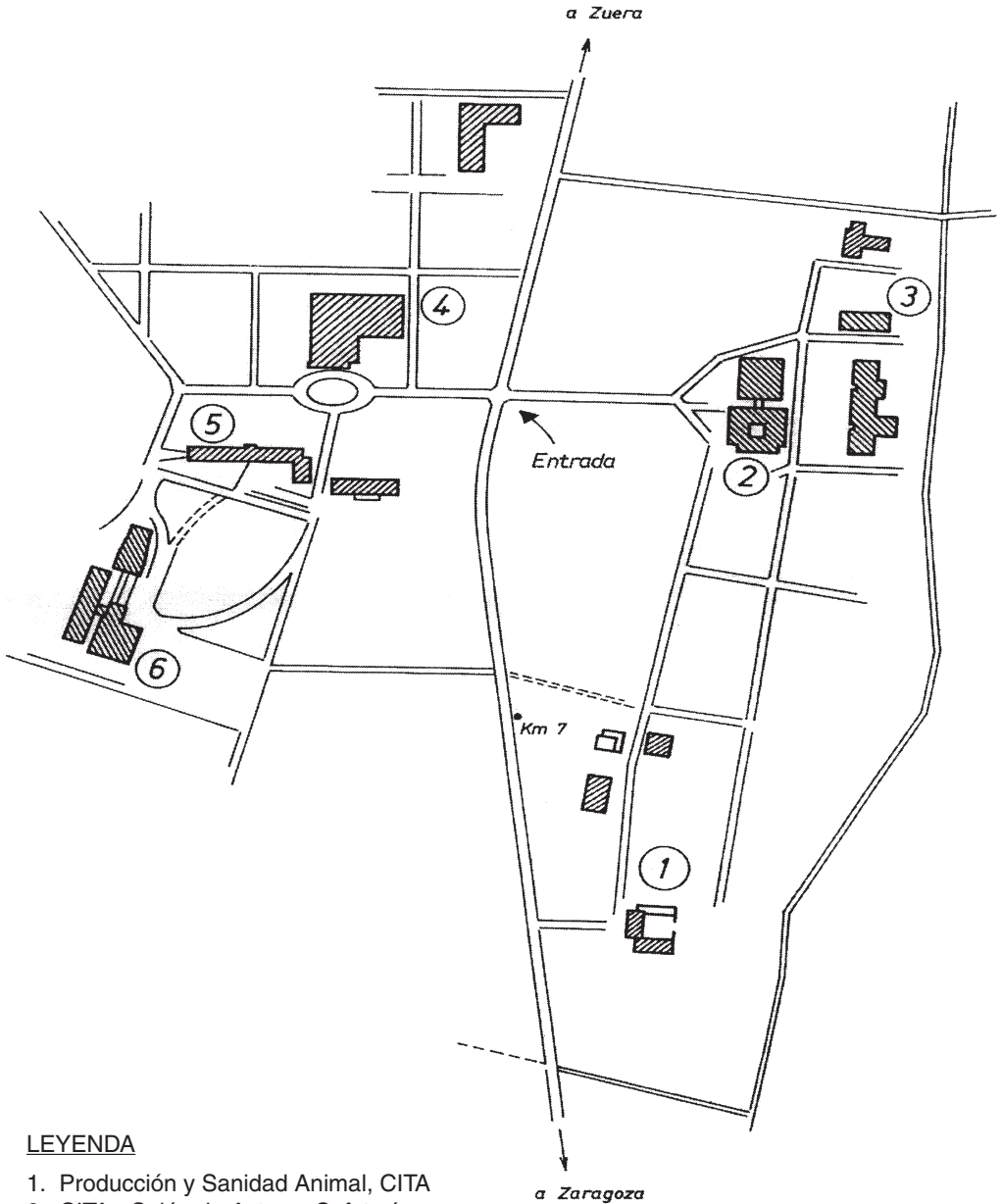
- En la A-2 tomar la Salida 327 y seguir la indicación de la A-123 Montañana

HUESCA

- Desde la A-23 seguir dirección Z-40 todas direcciones.
- Al llegar al túnel tomar la Salida 15 Movera-Santa Isabel
- En Santa Isabel tomar la A-123 Montañana



CAMPUS de AULA DEI



LEYENDA

1. Producción y Sanidad Animal, CITA
2. CITA - Salón de Actos y Cafetería.
3. Biblioteca CITA
4. EEAD - Salón de Actos y Cafetería.
5. Comedor.
6. I.A.M.Z. - Salón de Actos, Otras Salas.

PROGRAMA XIII JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL, AIDA

Martes, 12 de mayo de 2009

Mañana:

	Genética	Patología	Nutrición - Alimentación	Sistemas - Economía	Calidad Productos	Reproducción
Lugar	Aula D	Sala de Juntas	Aula A	Aula C	Salón de Actos	Seminario B2
ENTREGA DE DOCUMENTACIÓN INAUGURACIÓN						
8:30 - 10:30	CONFERENCIA INAUGURAL "EL FUTURO DEL MUNDO AGRARIO EN EL CONTEXTO EUROPEO: UNAS REFLEXIONES DESDE BRUSELAS" (Ponente: D. Tomás García Azcárate) (Salón de Actos)					
10:30 - 11:00	Café					
11:00 - 14:30	QTLs y genes candidatos porcino (6c) (Mod. A. I. Fernández)	Ponencia invitada: <i>Extensión y límites del control antiparasitario</i> F. A. Rojo	Materias primas y nutrientes (7c) (Mod. N. Nicodemus)	Ruminantes (I) (7c) (Mod. A. Olaizola)	Calidad de la canal (13c) (Mod. P. Alberti)	Reproducción bovina (6c) (Mod. F. Forcada)
	QTLs y genes candidatos ruminantes (4c) (Mod. B. Gutiérrez-Gil)	Enfermedades parasitarias. Ruminantes (4c) (Mod. C. Calvete)	Alimentación de lechones (6c) (Mod. I. Fernández-Figares)	Ruminantes (II) (4c) (Mod. R. Ruiz)		Reproducción otras especies (6c) (Mod. T. Mogás)
14:30 - 15:30	Comida					

Martes, 12 de mayo de 2009

Tarde:

	Genética	Patología	Nutrición - Alimentación	Sistemas – Economía	Calidad Productos	Reproducción
<i>Lugar</i>	<i>Aula D</i>	<i>Sala de Juntas</i>	<i>Aula A</i>	<i>Aula C</i>	<i>Salón de Actos</i>	<i>Seminario B2</i>
15:30 - 16:30	Visita pie de póster	Enfermedades parasitarias. Equidos (3c) (Mod. J. Uriarte)	Alimentación de cerdos de cebo (4c) (Mod. M. A. Latorre)	Rumiantes (II) (2c) (Mod. R. Ruiz)	Análisis sensorial (4c) (Mod. M.M. Campo)	Gametos, fecundación y embriones (4c) (Mod. J. Gadea)
16:30 - 17:00	Pausa					
17:00 - 18:00	Discusión póster (12p) (Mod. M. Arnillas)	Especies silvestres (6c) (Mod. R. C. Mainar)	Alimentación de aves (4c) (Mod. P. Medel)	Rumiantes (III) (6c) (Mod. E. Molina)	Métodos analíticos (6c) (Mod. S. García)	Gametos, fecundación y embriones (5c) (Mod. J. Gadea)
18:00-19:00	Genética funcional (4c) (Mod. R. Pena)		Alimentación de conejos (3c) (Mod. A.I. García)			
19:00 h	Vino de AIDA					

Miércoles, 13 de mayo de 2009

Mañana:

	Genética	Patología	Nutrición - Alimentación	Sistemas - Economía	Calidad Productos	Reproducción
<i>Lugar</i>	<i>Aula D</i>	<i>Sala de Juntas</i>	<i>Aula A</i>	<i>Aula C</i>	<i>Salón de Actos</i>	<i>Seminario B2</i>
09:00 - 10:30	Parámetros genéticos: rumiantes (5c) (Mod. M.J. Carabaño)	Enfermedades infecciosas. No rumiantes (4c) (Mod. C. Calvete)	Alimentación y Calidad de la Leche (5c) (Mod. B. de la Roza)	No rumiantes I (4c) (Mod. D. Villalba)	Miscelánea (6c) (Mod. G. Indurain)	Semen rumiantes (6c) (Mod. J. Yániz)
10:30 - 11:00	Café					
11:00 - 14:30	Parámetros genéticos: monogástricos (5c) (Mod. L. Varona)	Enfermedades infecciosas y protozoos. Rumiantes (5c) (Mod. C. Marín)	Digestión Rumiantes I (6c) (Mod. J. Batcels)	No rumiantes II (4c) (Mod. D. Villalba)	Análisis instrumental (10c) (Mod. A. Horcada)	Semen monogástricos (7c) (Mod. J.A. Cebrián)
	Selección (7c) (Mod. A. Blasco)	Ponencia invitada: <i>Epidemiología de la Neosporosis bovina. Una perspectiva clínica</i> F. López-Gatius	Digestión Rumiantes II (6c) (Mod. S. Calsamiglia)	Automatización, identificación animal, bienestar animal I (4c) (Mod. J. Palacio)		
14:30-15:30	Comida					

Miércoles, 13 de mayo de 2009

Tarde:

	Genética	Patología	Nutrición - Alimentación	Sistemas - Economía	Calidad Productos	Reproducción
<i>Lugar</i>	<i>Aula D</i>	<i>Sala de Juntas</i>	<i>Aula A</i>	<i>Aula C</i>	<i>Salón de Actos</i>	<i>Seminario B2</i>
15:30 -16:30	Diversidad genética (3c) (Mod. F. Goyache)		Alimentación rumiantes miscelánea (5c) (Mod. S. López)	Automatización, identificación animal, bienestar animal II (4c) (Mod. J. Palacio)	Calidad de la grasa I (4c) (Mod. M.J. Bertain)	
16:30 - 17:00	<i>Pausa</i>					
17:00 – 17:30			Alimentación y Producción Rumiantes(8c) (Mod. P. Frutos)		Calidad de la grasa II (6c) (Mod. M.J. Bertain)	
17:30-19:00						
19:00 h	Asamblea de AIDA					

Jueves, 14 de mayo de 2009

II Simposio sobre metodologías aplicadas al estudio de la microbiología digestiva

Jornada Satélite	
<i>Lugar</i>	Sala A
09:00 - 10:30	<i>Conferencia inaugural: Microbiota intestinal, metabolismo e inmunidad</i>
10:30-11:00	Café
11:00 – 13:15	Microbiología digestiva: ruminantes in vivo (4c). Moderadora: L. Abecia
	Microbiología digestiva: ruminantes in vitro (5c) Moderadora: L. Abecia
13:15-14:30	Comida
14:30 - 16:45	Microbiología digestiva: otras especies (7 c) Moderador: J. Balcells
16:15-16:45	Pausa
16:45-18:15	Mesa Redonda

ÍNDICE

TOMO I

GENÉTICA

Genética: QTLs y Genes candidatos porcino

- Caracterización de los genes porcinos de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (SLC27A / FATP solute carrier family 27a). - Gallardo, D., Quintanilla, R., Pena, R.N. 3
- Estudio de los genes implicados en la cantidad y composición de la grasa intramuscular de los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* en una población Duroc. - Solé, M., Pena, R., Amills, M., Cánovas, A., Gallardo, D., Reixach, J., Díaz, I., Noguera, J.L., Quintanilla, R. 6
- Dos mejor que uno: interacción de polimorfismos RBP4-Mspi y ESR1-Pvull sobre el tamaño de camada en una línea porcina chino-europea. - Muñoz, M., Ovilo, C., Muñoz, G., Fernández, A., Alves, E., Silió, L. 9
- Análisis de dos QTL epistáticos en el cromosoma 12 porcino para el carácter tamaño de camada. - Fernández-Rodríguez, A., Rodríguez, M.C., Noguera, J.L., Balcells, I., Óvilo, C., Fernández, A.I. 12
- Análisis molecular de los genes de la apolipoproteína D (APOD) y low density lipoprotein receptor-related protein 12 (LRP12) porcinos. - Melo, C., Zidi, A., Quintanilla, R., Amills, M. 15
- Asociación entre el polimorfismo c.2002c>t del gen del receptor de leptina y el consumo voluntario de pienso en cerdos Duroc x Ibérico. - Rodríguez, M.C., Carrasco, C., Fernández, A., García, A., Carabias, A., Sanz, E., Rodríguez, A, de Mercado, E., Silió, L., Ovilo, C. 18

Genética: QTLs y Genes candidatos rumiantes

- Análisis de la distribución de partos de ovejas portadoras del alelo FECX^R del gen BMP15. - Laviña, A., Macías, A., Martín, E., Arellano, P., Murillo, S., Ponz, R., Monteagudo, L. V., Tejedor, M.T., Sierra, I., Vigil, E. 21
- Identificación de polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo lipídico en ganado caprino. - Zidi, A., Jordana, J., Carrizosa, J., Gallardo, D., Urrutia, B., Amills, M. 24
- Estudio de la variabilidad del gen de la acetil-CoA carboxilasa α (ACACA) en las razas ovinas Churra y Ojalada. - García-Fernández, M., Gutiérrez-Gil, B., García-Gámez, E., Arranz, J.J. 27
- Confirmación de un QTL con efecto sobre caracteres de producción de leche en la raza ovina Churra. - García-Gámez, E., Gutiérrez-Gil, B., García-Fernández, M., Sánchez, J.P., de la Fuente, L.F. San Primitivo, F., Arranz, J.J. 30

Genética: Posters: visita y discusión

- Estimación de la correlación genética entre sexos en los caracteres productivos de la raza bovina Pirenaica. - Archanco, C., Blanco, A., Castillo, A.J., Domingo, V., Oliver, L., Segarra, A., Tena, B., Altarriba, J, Moreno, C., Varona, L. 33

- Variabilidad del ADN mitocondrial y del cromosoma Y en la raza bovina Parda de Montaña. - Calvo, J.H., Sanz, A., Blanco, M., Zaragoza, P., Revilla, R., Villalba, D., Rodellar, C., Casasús, I.	36
- Medida de la conexión entre explotaciones de bovinos de carne de la raza Bruna dels Pirineus. - Tarrés, J., Fina, M., Piedrafita, J.	39
- Caracterización genética de la raza ovina Guirra mediante 8 marcadores microsatélites. - Viudes de Castro, M.P., Grimal, A., Vicente, J.S., Moce, E., Gómez, E.A.	42
- Variabilidad morfológica de poblaciones ovinas de raza Ripollesa. - Esquivelzeta, C., Fina, M., Bach, R., Madruga, C., Caja, G., Piedrafita, J.	45
- Variabilidad del ADN mitocondrial en cinco razas ovinas pirenaicas. - Ferrando, A., Casas, M., Marmi, J., Parés, P.M., Jordana, J.	48
- Búsqueda de QTL con influencia sobre prolificidad en el ganado ovino de raza Churra: análisis del cromosoma 26. - Gutiérrez-Gil, B., Sánchez, J.P., de la Fuente, L.F., Bayón Y., San Primitivo, F., Arranz J.J.	51
- Identificación de polimorfismos del cromosoma Y en la especie caprina. - Vidal, O., Pérez-Serra, A., Badaoui, B., Capote, J., Martínez, A., Delgado, J., Pla, C., Amills, M.	54
- Detección de introgresión de genes de perdiz Chukar (<i>Alectoris chukar</i>) en poblaciones silvestres de perdiz Roja (<i>A. rufa</i>) de la provincia de Álava. - García, C.B., Bonafonte, J.I., Gálvez, A., Martínez-Sañudo, M.J., Graus, J., Arruga, M.V.	57
- Detección cuellos de botella en la gallina Valenciana de Chulilla. - Grimal, A., Gómez, E.A., Viudes de Castro, M.P.	60
- Variabilidad nucleotídica longitudinal en una región candidata para QTL del cromosoma 4 porcino. - Ojeda, A., Ramos, S., Marletta, D., Folch, J.M., Pérez-Enciso, M.	63
- Comparación de cuatro kits comerciales de extracción de ARN bacteriano a partir de muestras de leche. - Secchi, S., Serrano, A., García-Nogales, P., Gutiérrez, S., Arís, A.	66
Genética: Genética funcional	
- Transcripción diferencial entre machos y hembras de genes porcinos relacionados con la eliminación de escatol y androstenona en hígado. - Fernández, A.I., Fernández, A., Pérez-Montarelo D., Fernández-Rodríguez A., Barragán C., Nieto M., Rodríguez M.C., Toro M.A., Silió L., Óvilo C.	69
- Análisis de genes diferencialmente expresados para prolificidad en un cruce F2 entre cerdo Ibérico y Meishan. Resultados preliminares. - Martínez-Giner, M., Pena, RN., Fernández-Rodríguez, A., Tomàs, A., Noguera, JL.	72
- El gen HMGCRC porcino: estudio estructural y funcional de su promotor. - Cánovas, A., Quintanilla, R., Reecy, J.M., Marqués, M., Pena, RN.	75
- Efecto de la selección contra grasa dorsal a grasa intramuscular constante en la expresión proteica de las enzimas ACC Y SCD porcinas. - Cánovas, A., Tor, M., Pena, RN., Doran, O., Estany, J.	78
Genética: Parámetros genéticos: rumiantes	
- Análisis multivariante de coeficientes específicos de depresión endogámica asociados a fundadores. - Varona, L., Moreno, C., Altarriba, J.	81
- Análisis genético de las características sensoriales medidas en dos cortes comerciales de Avileña Negra Ibérica. - López de Maturana, E., Carabaño, M. J., Díaz, C.	84

- Parámetros genéticos y tendencias genéticas asociados a caracteres productivos y de apariencia del vellón en alpacas. - Cervantes, I., Goyache, F., Pérez-Cabal, M.A., Nieto, B., Salgado, C., Burgos, A., Gutiérrez, J.P.	87
- Interacciones GxE y heterogenidad genética entre lactaciones en la oveja Churra. - Sánchez, J. P., de la Fuente, L. F., Carriedo, J. A., San Primitivo, F.	90
- Búsqueda de un gen de gran efecto para prolificidad en la raza Manchega. - Cano-Ortiz, P., Ramón, M., Jurado, J.J., Serrano, M., Pérez-Guzmán, M.D.	93
Genética: Parámetros genéticos: monogástricos	
- Parámetros genéticos del semen descongelado de conejo. Resultados preliminares. - Lavara R., Mocé E., García M.L., Vicente J.S., Baselga M.	96
- Análisis genético de los caracteres de fertilidad y velocidad de crecimiento en la hembra de conejo. - Tusell, LL., Rafel, O., Ramon, J., Piles, M.	99
- Modelo recursivo con puntos de cambio. Una aplicación al tamaño de camada y el número de lechones nacidos muertos. - Escriche, N., López de Maturana, E., Noguera, J.L., Varona, L.	102
- Correlación genética y fenotípica entre asimetría fluctuante, inmovilidad muscular y cociente de leucocitos en gallinas. - Campo, J.L., Dávila, S.G., Gil, M.G., Muñoz, I.	105
- Evaluación genética del caballo trotador español mediante un modelo thrustoniano. Gómez, M.D., Varona, L., Valera, M., Molina, A.	108
Genética: Selección	
- Selección por tasa de ovulación en conejo. estudio preliminar de la correlación entre tasas de ovulación. - Laborda, P., Mocé, M.L., Santacreu, M.A.	111
- Selección divergente por variabilidad en el tamaño de camada en conejo. Resultados de las dos primeras generaciones. - Argente, M.J., Garcia, M.L., Muelas, R., Santacreu, M.A., Blasco, A.	114
- Selección divergente por consumo de agua en la codorniz japonesa. determinación genética del carácter y respuesta a la selección. - Ragab, M., Peiró, R., Saleh, K., Younis, H., Nogal, R., Baselga, M.	117
- Respuesta a la selección contra grasa dorsal a grasa intramuscular constante en cerdos Duroc. - Reixach, J., Tor, M., Estany, J.	120
- Plan de implantación de la selección genómica en la población de vacuno de leche en España. - González-Recio, O., Carabaño, M.J., Pena, J., Díaz, C., Ugarte, E., Alenda, R.	123
- Detección de SNPs redundantes en genotipados de alta densidad y uso de BAGGING para incrementar la precisión en la pre-selección de SNP para la selección genómica. - González- Recio, O., Naya, H., Weigel, K. A., Gianola, D., Rosa, G.J.M.	126
- Selección de reproductores basada en el genotipo del gen MC1R en las razas equinas asturcón y Mallorquín. Royo, L.J., Álvarez, I., Pérez-Pardal, L., Fernández, I., Rincón, C., Lorenzo, L., Payeras, L., Gutiérrez, J.P., Goyache, F.	129
Genética: Diversidad Genética	
- Haplogrupos del cromosoma Y en la cabra Bermeya de Asturias y otras razas españolas. - Royo, L.J., Pérez-Pardal, L., Azor, P.J., Álvarez, I., Rincón, C., Fernández, I., Guerra, V., Gutiérrez, J.P., Goyache, F.	131

- Variabilidad de los genes del color de la capa en el ganado caprino. - Badaoui, B., Capote, J., Jordana, J., Ferrando, A., Vidal, O., Martínez, A., Delgado, J. V., D'Andrea, S., Pilla, F., Amills, M. 134
- Variabilidad nucleotídica del gen cortisol binding globulin (CBG). Esteve, A., Ojeda, A., Folch, J.M., Pérez-Enciso, M. 137

PATOLOGÍA ANIMAL

Patología animal: Enfermedades Parasitarias. Rumiantes

- Prevalencia e intensidad de parasitación en granjas de pequeños rumiantes en Galicia. - Cienfuegos, S., Díaz, P., Vázquez, L., Dacal, V., Lago, N., Pato, J., Fernández, G., Panadero, R., Viña, M., Morrondo, P., Díez, P., López, C. 143
- Efecto de la esparceta, zulla y artemisia en el desarrollo de la infección de corderos por *Haemonchus contortus*. - Valderrábano, J., Gómez-Rincón, C., Calvete, C., Uriarte, J. 146
- Evaluación de la eficacia del nitroxinil en infecciones naturales de *Fasciola hepática* en una explotación de ovino resistente al triclabendazol. - Martínez-Valladares, M., Famularo, M. R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Rojo-Vázquez, F.A. 149
- Efecto del nivel de nutrición sobre la resistencia de *Haemonchus contortus* frente a bencimidazoles en ovejas. - Calvete, C., Calavia, R., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Lacasta, D., Ruíz-de-Arkaute, M., Valderrábano, J., Uriarte, J. 152

Patología animal: Enfermedades Parasitarias. Equidos

- Control de miasis y ectoparasitosis en caballos en silvopastoreo. - Cortiñas, F.J., Francisco, I., Arias, M., Sánchez, J.A., Francisco, R., Suárez, J.L., Mochales, E., Vázquez, L., Mula, P., Scala, A., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. 155
- Evolución estacional de las larvas de *Rhinoestrus* spp. en caballos mantenidos en una zona de clima mediterráneo. - Mula, P., Francisco, I., Arias, M., Cortiñas, F.J., Suárez, J.L., Sánchez, J.A., Romasanta, A., Paz-Silva, A., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Scala, A. 158
- Epidemiología de las infecciones por estróngilos en équidos en sistemas de producción extensiva de Galicia: Periodos de riesgo. - Francisco, I., Arias, M., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Mochales, E., Mula, P., Suárez, J.L., Prado, J., Uriarte, J., Díez-Baños, P., Sánchez, J.A., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. 161

Patología animal: Especies silvestres

- Investigación de *Triquinella* spp. en zorros de Catalunya. - Fàbregas, X., Colomer, A., Alemany, A., Vila, C., Nogal, J.J., Bolás-Fernández, F., López, S. 164
- Caracterización de un modelo murino para el estudio de la infección por *Brucella microti*. - Jiménez de Bagüés, M.P., Mitjana, O., Köhler, S. 167
- Resistencia a la reinfección por *Brucella microti* en un modelo murino. - Jiménez de Bagüés, M.P., Mitjana, O. 170
- Influencia de la dieta sobre la parasitación por nematodos gastrointestinales en corzos (*Capreolus capreolus*) de Galicia. - Vázquez, L., Dacal, V., Pato, F.J., Díaz, P., Fernández, G., Suárez, J.L., Mochales, E., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P. 173

- Especies de nematodos gastrointestinales compartidas por corzos (*Capreolus capreolus*) y ganado vacuno en pastoreo en Galicia. - Pato, F.J., Vázquez, L., Painceira, A., Díaz, P., Uriarte, J., Díez-Baños, N., Dacal, V., López, C., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P. 176
- Infecciones por coccidios eiméricos que afectan a corzos y a ganado vacuno en extensivo en Galicia. - Díaz, P., Dacal, V., Vázquez, L., Pato, J., Paz, A., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., Francisco, I., Cienfuegos, S., Díez-Baños, P., Morrondo, P. 179

Patología animal: Enfermedades Infecciosas. No rumiantes

- Prevalencia de *Salmonella* spp en cerdos de cebo en Aragón. - Vico, J.P., Mainar-Jaime, R.C. 182
- Caracterización epidemiológica de la salmonelosis porcina en cerdos sacrificados en Aragón. - Vico, J.P., Mainar-Jaime, R.C. 185
- Estudio del efecto de la enteropatía epizoótica del conejo sobre los rendimientos productivos en dos cebos consecutivos. - Romero, C., Nicodemus, N., Chamorro, S., García-Ruiz, A.I., Ibáñez, M.A., De Blas, C. 188
- Efecto de la camada y las condiciones ambientales sobre la mortalidad de gazapos en periodos con distinta incidencia de enteropatía epizoótica del conejo. - Romero, C., Nicodemus, N., Chamorro, S., Corujo, A., Martínez-Morentin, C.G., Margüenda, I., De Blas, C. 191

Patología animal: Enfermedades Infecciosas y protozoos. Rumiantes.

- Estudio de la prevalencia de la enfermedad de Maedi-Visna en las explotaciones de ovino de carne en la provincia de Lugo. - Fernández, G., Lago, N., Pato, F.J., Viña, M., Cienfuegos, S., López, C., Vázquez, L., Dacal, V. 194
- Compartimentalización de lentivirus de pequeños rumiantes en ovinos con cuadro clínico nervioso (Visna). - Ramírez, H., Hernández, M.M., Cenoz, A., Glaría, I., de Andrés, X., Crespo, H., San Román, B., Jáuregui, P., Reina, R., Grilló, M.J., Benavides, J., Polledo, L., Pérez, V., García-Marín, J.F., Amorena, B., de Andrés, D. 197
- Efecto asociado a la respuesta inmune celular en vacunación ADN frente al virus del Maedi-Visna. De - Andrés, X., Reina, R., Ramírez, H., Crespo, H., Glaría, I., Pérez, M., Grilló, M.J., Luján, L., Blacklaws, B., Niesalla, H., Harkiss, G., de Andrés, D., Amorena, B. 200
- Seroprevalencia de *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en ganado ovino de Galicia. - Panadero, R., Díaz, P., Cienfuegos, S., Painceira, A., López, C., Vázquez, L., Dacal, V., Lago, N., Pato, J., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P. 203
- Producción de interferón gamma (IFN- γ), niveles plasmáticos de proteínas asociadas a la gestación (PAG-1) y anticuerpos IgG1 e IgG2 durante la gestación en vacas de aptitud lechera crónicamente infectadas por *Neospora caninum*. - Bech-Sàbat, G., López-Gatius, F., Nogareda, C., García-Ispierto, I., Serrano, B., Santolaria, P., Yáñez, J. L., Almería, S. 206

NUTRICIÓN – ALIMENTACIÓN

Nutrición – Alimentación: Materias primas y nutrientes

- Estudio comparativo del contenido en azúcares (sacarosa, estaquiosa y rafinosa) de la harina de soja según procedencia. - González, M., Hermida, M., Sueiro, S., Serrano, M.P., Mateos, G.G. 211

- Influencia del origen de la harina de soja sobre la composición química, el valor nutricional y la calidad de la proteína. - Mateos, G.G., Sueiro, S., Rebollar, P.G., Serrano, M.P., González, M., Lázaro, R. 214
- Estudio preliminar para identificar el origen de las harinas de soja mediante tecnología NIRS y medición del color. - Núñez-Romero, N., García-Rebollar, P., Lázaro, R., Serrano, M.P., Mateos, G.G. 217
- Contenido en inhibidores de tripsina de la harina de soja según origen: comparación de dos métodos analíticos. - Sueiro, S., Hermida, M., González, M., Serrano, M.P., Mateos, G.G. 220
- Influencia del tiempo de almacenaje sobre los parámetros de calidad de la harina de soja. - Sueiro, S., Frikha, M., Serrano, M.P., Hermida, M., Mateos, G.G. 223
- Utilización del análisis de componentes principales para investigar el origen de harinas de soja de diferentes países. - García-Rebollar, P., Núñez-Romero, N., Serrano, M.P., Hermida, M., Lázaro, R., Mateos, G.G. 226
- Respuesta de la proteína a la extrusión de un pienso completo, evaluada por pruebas de crecimiento, balance y sacrificio con ratas. - Pérez-Calvo, E., Castrillo, C., Baucells, M.D., de la Fuente, G. 229

Nutrición – Alimentación: Alimentación de lechones

- Efectos de incorporar salvado de trigo y modificar el tránsito digestivo sobre la adaptación del lechón recién destetado. - Molist, F., Ywazaki, M., Gómez de Segura, A., Hermes, R.G., Gasa, J. y Pérez, J.F. 232
- Influencia del cereal y el nivel de fibra sobre la ingestión de pienso y los parámetros digestivos del lechón. - Hermes, R.G., Molist, F., Ywazaki, M., Gómez de Segura, A., Torrallardona, D., Gasa, J., Pérez, J.F. 235
- Influencia de la fuente de almidón y proteína del pienso sobre la digestibilidad de los nutrientes y rendimiento productivo de lechones. - Parera, N., Serrano, M.P., Valencia, D.G., Lázaro, R., Mateos, G.G. 238
- Efecto del nivel de triptófano en el pienso de lactación sobre la productividad de la cerda y sus lechones. - Muns, R., Solà-Oriol, D., Agostini, P.S., Martín-Orué, S.M., Pérez, J.F., Cirera, M., Corrent, E., Gasa, J. 241
- Efecto del nivel proteico de la dieta y del plano de alimentación sobre el crecimiento y el balance de nitrógeno de lechones Ibéricos en fase de cría (10-25 kg PV). - Conde-Aguilera J.A., Aguinaga M.A., Aguilera J.F., Nieto R. 244
- Evaluación del crecimiento y del consumo de pienso de lechones Ibéricos destetados a diferentes edades. - Izquierdo, M., Bazán, J., Ayuso, D., Paniagua, M. 247

Nutrición – Alimentación: Alimentación de cerdos de cebo

- La pulpa cítrica como ingrediente alternativo en alimentación de cerdos pesados: resultados preliminares. - Cerisuelo, A., Moset, V., Olivas, I., Villagrà, A., Piquer, O., Fernández, C., Torres, A., Gasa, J., Lainez, M. 250
- Efecto de la betaína, el ácido linoleico conjugado, o ambos, sobre el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular de jamón y paleta en cerdos Ibéricos en crecimiento. - Rodríguez-López, J.M., González-Valero, L., Rojas-Cano, M.L., Lachica, M., Lara, L., Fernández-Fígares, I. 253
- Efecto de la betaína y el ácido linoleico conjugado sobre los diversos cortes y tejidos de la canal de cerdos Ibéricos. Análisis alométrico. - Rojas-Cano, M.L., Lara, L., Lachica, M., Fernández-Fígares, I. 256

- Efecto de la betaína, el ácido linoleico conjugado o ambos sobre la digestibilidad de la grasa y ácidos grasos en cerdos Ibéricos en crecimiento. - González-Valero, L., Rodríguez-López, J.M., Lachica, M., Fernández-Fígares, I. 259

Nutrición – Alimentación: Alimentación de aves

- Efecto del origen de la harina de soja y de la estirpe de pollos sobre los parámetros productivos de 1 a 37 días de edad. - Frikha, M., Serrano, M.P., Jiménez-Moreno, E., Habboul, M. y Mateos, G.G. 262
- Efecto del origen de la harina de soja sobre los parámetros productivos en pollos de engorde. - Solà-Oriol, D., Pérez, J.F., Mateos, G.G. 265
- Efecto de la suplementación dietética con Eugenol sobre los rendimientos productivos, microbiota y morfología intestinal en pollos de carne. - Solà-Oriol, D., Nofrarias, M., Anguita, M., Barroeta, A.C., Gasa, J. 268
- Efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre la retención de energía y grasa en pollos de carne. - Salari, S., Cánovas, E., Barroeta, A.C., Gasa, J. 271

Nutrición – Alimentación: Alimentación de conejos

- Digestibilidad de dietas con distintas relaciones de fibra muy digestible/poco digestible en conejos de cebo: contribución de los tramos del tracto gastrointestinal. - Rodríguez-Romero, N., Abecia, L., Rodríguez, R., Balcells, J., Fondevila, M. 274
- Dietas fibrosas en conejas durante la recría: I concentraciones séricas de leptina y glucosa. - Rebollar, P.G., Millán, P., Nicodemus, N., Marchán, F., Lorenzo, P.L. 277
- Dietas fibrosas en conejas durante la recría: II concentraciones séricas de NEFA y proteínas totales. - Rebollar, P.G., Millán P., Lorenzo, P.L., Marchán, F., Nicodemus, N. 280

Nutrición – Alimentación: Alimentación y calidad de la leche

- Efecto de la suplementación de la dieta con aceites de girasol y pescado sobre el rendimiento productivo de los animales y el perfil de ácidos grasos de la leche de ovejas. - Toral, P.G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., de la Fuente, M.A., Juárez, M., Hervás, G. 283
- Incorporación de aceites vegetales en raciones de ovejas Churras durante el inicio de lactación: efecto sobre la composición de la leche y el crecimiento de los lechazos. - Bodas, R., Manso, T., Castro, T., Jimeno, V., Román, T., Mantecón, A.R. 286
- Influencia de la composición de la dieta completa suplementada con distintos tiempos de pastoreo sobre el perfil de ácidos grasos en leche. - Morales-Almaráz, E., Vicente, F., González, A., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., de la Roza-Delgado, B. 289
- Impacto del pastoreo en el perfil de ácidos grasos de la leche en ganaderías semin-tensivas. - Vicente, F., Rodríguez, M.L., Morales-Almaráz, E., González, A., de la Roza-Delgado, B. 292
- Efecto de trans-10, cis-12 ácido linoleico conjugado sobre el porcentaje de grasa en vacas lecheras. - Cegarra, E., Hermida, M., Viana, J.M., Iglesias, A. 295

Nutrición – Alimentación: Digestión Rumiantes I

- Efecto de la relación forraje:concentrado y del tipo de forraje de la dieta sobre las poblaciones de protozoos en el rumen de ovejas y en fermentadores RUSITEC. - Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., Carro, M.D. 298
- Evaluación cuantitativa y cualitativa de tres métodos de desligamiento de bacterias asociadas a la fase sólida de la digesta ruminal en fermentadores RUSITEC. - Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., Saro C., Carro, M.D. 301

- Estudio de la variabilidad individual en las concentraciones de distintas comunidades microbianas del rumen de caprino. - Yáñez-Ruiz, D.R., Soto E.C., Newbold C.J., Molina-Alcaide E. 304
- Efectos de cambios en la dieta y la adición de levaduras sobre la fermentación microbiana ruminal de terneras. - Moya, D., Calsamiglia, S., Ferret, A., Fandiño, J.I., Castillejos, L., Yoon, I. 307
- Efecto de cenizas procedentes de la obtención de energía renovable a partir de biomasa residual sobre la fermentación ruminal *in vitro* de dietas basadas en heno de alfalfa. - Romero-Huelva, M, Martín-García, A. I., Nogales, R., Molina-Alcaide, E. . . . 310
- Utilidad del hexatriacontano (C36) como marcador de tránsito digestivo, y efecto del procedimiento analítico sobre la utilidad del Cr-EDTA y del YbCl₃ como marcadores de flujo. - Keli, A., de Vega, A., Askar, A., Guada, J.A. 313

Nutrición – Alimentación: Digestión Rumiantes II

- Estudio comparativo de los efectos del tipo de forraje y de la proporción forraje – concentrado sobre la fermentación ruminal en cabras y en fermentadores de flujo simple continuo. - Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R, Molina-Alcaide, E. 316
- Efecto del pH y del nivel de concentrado de la dieta sobre la producción de intermediarios de la biohidrogenación en cultivo continuo. - Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Cardozo, P.W. 319
- Estudio del efecto de la ausencia de protozoarios y el tipo de ración sobre la fermentación y síntesis microbiana en el rumen. - Belanche, A., de la Fuente, G., Balcells, J. 322
- Efectos del modelo de tránsito y de la contaminación microbiana en el rumen sobre las estimas *in situ* de utilización digestiva de diferentes alimentos. - González, J., Moubi, R., Guevara, J., Arroyo, J.M^a. 325
- Efectos del uso de sulfito sódico para estimar el contenido y degradabilidad ruminal de la fibra neutro detergente y su N asociado en diferentes tipos de alimentos. - Guevara, J., González, J., Moubi, R., Arroyo J.M^a., Alvir, M.R. 328
- Efecto de la adición de un hidrolizado de levadura sobre la fermentación ruminal *in vitro* de dos dietas. - Saro, C., Pérez, M., Martínez, M.E., Ramos, S., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D. 331

Nutrición – Alimentación: Rumiantes Miscelánea

- Técnica de visión artificial para estimar el área de las papilas y la superficie de la mucosa ruminal. - Devant, M., Nafrarías, M., Bach, A. 334
- Desarrollo de un modelo animal para evaluar las preferencias oro-sensoriales en terneras destetadas y su aplicación para determinar preferencias entre ingredientes energéticos. - Montoro, C., Boe, F., Ipharraguerre, I., Bach, A. 337
- Predicción de la composición bromatológica en dietas completas: clonación de instrumentos y transferencia de ecuaciones NIRS en producto intacto. - Soldado, A., De la Roza-Delgado, B., Martínez-Fernández, A., Vicente-Mainar, F., López, L., Díaz-Bueno, E. 340
- Aplicación de la tecnología NIRS para estimar los parámetros de cinética de fermentación ruminal de forrajes procedentes de zonas áridas de Túnez. - Opsi, F., Ammar, H., Andrés, S., Kamoun, M., González, J.S., López, S. 343
- Los aceites esenciales podrían reducir el riesgo de cetosis en cabras lecheras con gestación múltiple. - Cavini, S., Calsamiglia, S., Bouattour, A., Ferret, A. y Bravo, D. . . 346

Nutrición – Alimentación: Alimentación y Producción Rumiantes

- Inclusión de *Urtica dioica* en la ración de corderos en la fase de cebo. - Bodas, R., López-Campos, Ó., Mantecón, A.R., López, S., González, J.S., Giráldez, F.J. 349
- Efectos de la inclusión de aceites vegetales en raciones de cebo de corderos sobre la digestibilidad y los rendimientos productivos. - Castro, T., Manso, T., Jimeno V., Isabel, B., Rodríguez E. 352
- El uso de glicerina en dietas de corderos y ovejas. -Terré, M., Casado, P., Bach, A. . 355
- Evaluación del polietilenglicol (PEG-6000) como marcador indigestible para ovejas lecheras en estabulación o pastoreo. - Caja, G., Ralha, V.M., Albanell, E. 358
- Complementación con ensilados de maíz y hierba en la alimentación de vacas lecheras en pastoreo en el altiplano central mexicano. - Hernández-Ortega, M., Heredia-Nava, D., Espinoza-Ortega, A., Sánchez-Vera, E., Arriaga-Jordán, C.M. . . . 361
- Cambios en las comunidades bacterianas del rumen asociados al consumo de hojas jóvenes de roble (*Quercus pyrenaica*) y su posible relación con la aparición de intoxicaciones en ganado vacuno. - Belenguer, A., Hervás, G., Doce, R.R., Yáñez-Ruiz, D.R., Santos N., Mantecón, A.R., Frutos P. 364
- Utilización de un sistema de alimentación mecanizado en ovino de carne: I. Efecto sobre el consumo y los costes de alimentación. - Miguel, J.A., Calvo, J.L., Ciria, J., Asenjo, B. 367
- Utilización de un sistema de alimentación mecanizado en ovino de carne: II. Efecto sobre la evolución del peso de las ovejas en diferentes estados fisiológicos. - Asenjo, B., Calvo, J.L., Ciria, J., Miguel, J.A. 370

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Abecia, J.A.	696, 702, 705	Arias, M.S.	179
Abecia, L.	274, 784, 796	Arias-Álvarez, M.	687
Adelantado, C.	787	Aris, A.	66, 475, 778
Agostini, P.S.	241, 466	Arosemena, E.L.	787
Aguilera J.F.	244	Arranz, J.J.	27, 30, 51, 781
Aguinaga M.A.	244	Arriaga-Jordán, C.M. ...	361
Ait-Amer-Meziane, M. ..	696, 702	Arroyo, J.M ^a	325, 328
Alabart, J.L.	678	Arruga, M.V.	57
Albanell, E.	358	Asenjo, B.	367, 370, 702
Albertí, P.	532, 553, 556, 559	Askar, A.	313
Albiñana, B.	666	Atucha, N.T.	735
Alcalde, M.J.	493, 589	Ávila, A.	487
Alemaný, A.	164	Avilés-López, K.	735
Alenda, R.	123	Ayuso, D.	247, 451
Alfonso, L.	508, 595	Azor, P.J.	131
Alierta, S.	481, 517, 520	Bach, A.	334, 337, 355, 475, 616, 778
Almería, S.	206, 648, 651, 654	Bach, R.	45
Alonso, M.	640	Badaoui, B.	54, 134
Alonso, V.	571, 583	Balcells, I.	12
Altarriba, J.	33, 81	Balcells, J.	274, 322, 751, 784
Álvarez, I.	129, 131, 637	Balmes, G.	778
Álvarez, M.	675	Barragán C.	69
Álvarez-Rodríguez, J. ..	397, 427, 660	Barroeta, A.C.	268, 271
Alves, E.	9	Baselga, M.	96, 117
Alvir, M.R.	328	Baucells, M.D.	229, 787
Amazán, D.	538, 586	Bayón, Y.	51
Ameen, F.	382	Bazán, J.	247, 451
Améndola, M.R.D.	421	Bech-Sàbat, G.	206, 645, 648, 651, 654, 657
Amills, M.	6, 15, 24, 54, 134	Belanche, A.	322, 751
Ammar, H.	343	Belenguer, A.	364, 754
Amorena, B.	197, 200	Beltrán de Heredia, I. ..	379, 672
Andrés, S.	343, 757, 775	Beltrán, J.A.	526, 529, 571, 583, 601
Andrés, X.	200	Benavides, J.	197
Andrínua, I.	535	Beriain, M.J.	562
Anel, L.	675	Bernués, A.	379, 394, 397, 412, 532
Anguita, M.	268	Blacklaws, B.	200
Aparicio, N.	675	Blanco, A.	33
Arana, A.	562	Blanco, M.	36, 388, 394, 427
Archanco, C.	33		
Arellano, P.	21		
Argente, M.J.	114		
Arias, M.	155, 158, 161		

AUTORES**Páginas**

Blanch, E.	729, 732
Blasco, A.	114, 592
Blasco, I.	412
Bodas, R.	286, 349, 424, 757
Boe, F.	337, 616
Bolás-Fernández, F.	164
Bonafonte, J.I.	57
Bouattour, A.	346
Bravo, D.	346
Brito, N.V.	565, 640
Buffoni, A.	87, 702
Burgueño, F.J.A.	421
Caballero de la Calle, J.R.	457
Caballero, J.V.	457
Caja, G.	45, 358, 460, 463
Calavia, R.	152
Calsamiglia, S.	307, 319, 346, 769
Calvete, C.	146, 152
Calvo, J.H.	36, 388, 678
Calvo, J.L.	367, 370, 702
Calvo, M.A.	787
Calvo, S.	502, 574
Calle, M.I.	457
Cámara, L.	499
Camo, J.	556
Campo, J.L.	105
Campo, M.M.	526, 529, 532, 559, 571, 583, 601, 604
Candeias, G.	472
Cano-Ortiz, P.	93
Cánovas, A.	6, 75, 78
Cánovas, E.	271
Cantalapiedra-Hijar, G.	316, 763
Cañeque, V.	637
Capote, J.	54, 134
Capra, G.	622
Carabaño, M.J.	84, 123
Carabias, A.	18
Cardozo, P.W.	319
Carné, S.	460, 463
Carrasco, C.	18

AUTORES**Páginas**

Carriedo, J.A.	90
Carrión, D.	666
Carrizosa, J.	24
Carro, M.D.	298, 301, 331, 760, 772, 781
Carvalho, G.	406, 409
Carvalho, J.	726
Casado, P.	355
Casal, S.	640
Casao, A.	696, 702, 705, 723
Casas, M.	48
Casasús, I.	36, 388, 394, 412, 427, 660
Castañón-Ordóñez, L.	149
Castillejos, L.	307
Castillo, A.J.	33
Castrillo, C.	229
Castro, T.	286, 352
Catalá, M.	684, 693
Cavini, S.	346
Ceacero, F.	418, 666
Cebrián-Pérez, J.A.	696, 717, 720, 723
Cegarra, E.	295
Cenoz, A.	197
Cerisuelo, A.	250
Cerqueira, E.	406, 409
Cervantes, I.	87
Cienfuegos, S.	143, 179, 194, 203
Cirera, M.	241
Ciria, J.	367, 370
Colás, C.	717
Colomer, A.	164
Colléll, M.	466
Conde-Aguilera J.A.	244
Congost, S.	412
Cordero, G.	538, 619, 634
Córdova, B.L.	699
Corral, J.M.	568
Correa-Guimaraes, A.	663
Corrent, E.	241
Cortiñas, F.J.	155, 158, 161, 173
Corujo, A.	191

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Coy, P.	690	Díez-Baños, P.	161, 173, 176, 179, 203
Crespo, H.	197, 200	Doce, R.R.	364
Criado, M.	628	Domingo, V.	33
Curbelo, P.	625	Doran, O.	78
Chacón, G.	478, 481, 517	Echegoyen, E.	678
Chamorro, S.	188, 191	Echenique, A.	622
Chaveinte, C.	499	Eguinoa, P.	436
D'Andrea, S.	134	Eliceits, P.	430, 433
Dacal, V.	143, 173, 176, 179, 194, 203	Eras, J.	544
Dahmani, Y.	741, 744	Escós, J.	481
Dávila, S.G.	105	Escribano, A.	385
Daza, A.	487, 538, 547, 586, 619, 634	Escribano, M.	385
de Andrés, D.	197, 200	Escriche, N.	102
de Andrés, X.	197	Espejo, A.M.	415
de Blas, C.	188, 191	Espejo, M.	415
de Felicio, P.E.	577, 613	Espinoza-Ortega, A.	361
de la Fuente, G.	229, 322, 751	Esquivelzeta, C.	45
de la Fuente, J.	514, 637	Estany, J.	78, 120, 544
de la Fuente, L.F.	30, 51, 90	Esteve, A.	137
de la Fuente, M.A.	283	Estévez, J.A.	418, 666
de la Roza-Delgado, B.	289, 292, 340	Fàbregas, X.	164
de la Torre, J.L.	475	Falkenstein, E.	781
de Ondiz, A.	681, 690	Famularo, M.R.	149
de Pedro, E.	541	Fandiño, J.I.	307
de Vega, A.	313	Fantova, E.	607, 678
Delgado, J.	54	Felício, P.E.	580
Delgado, J.V.	134	Fernandes, A.	598
Devant, M.	334, 475	Fernandes, A.A.O.	400
Di Masso, R.J.	669	Fernández, A.	9, 18, 69
Días, M.P.	577	Fernández, A.I.	12, 69
Díaz, C.	84, 123	Fernández, A.M.	490
Díaz, I.	6	Fernández, C.	250, 637
Díaz, M.T.	514, 637	Fernández, E.	469
Díaz, P.	143, 173, 176, 179, 203	Fernández, G.	143, 173, 194, 203
Díaz-Bueno, E.	340	Fernández, I.	129, 131
Díez, B.	379, 672	Fernández-Fígares, I.	253, 256, 259
Díez, P.	143, 424	Fernández-Pato, N.	149
Díez-Baños, N.	176	Fernández-Rodríguez, A.	12, 69, 72
		Ferrando, A.	48, 134
		Ferrer, J.	388
		Ferrer, L.M.	152

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Ferret, A.	307, 346	García-Tomás, M.	741, 744
Fina, M.	39, 45	García-Torres, S.	625
Flamarique, F.	508	García-Vázquez, F.	738
Folch, J.	678	Garrido, A.	541
Folch, J.M.	63, 137	Gasa, J.	232, 235, 241, 250, 268, 271, 448, 466
Fondevila, M.	274, 784	Gaspar, P.	385
Forcada, F.	696, 702, 705	Gaspar-López, E.	418, 666
Francesch, A.	744	Gianola, D.	126
Francisco, I.	155, 158, 161, 179	Gil, M.G.	105
Francisco, R.	155, 161, 173	Giráldez, F.J.	349, 757
Frikha, M.	223, 262	Glaría, I.	197, 200
Frutos, P.	283, 364, 754	Gomes-Alves, S.	675
Fuentes, M.C.	319, 769	Gómez de Segura, A.	232, 235, 787, 790
Fuentetaja, A.	499	Gómez, E.	439
Gadea, J.	738	Gómez, E.A.	42, 60
Gaias, G.	616	Gómez, J.A.	666
Galvani, D.B.	511	Gómez, M.D.	108
Gálvez, A.	57	Gómez-Cortés, P.	283
Gallardo, D.	3, 6, 24	Gómez-Rincón, C.	146, 741, 744
Gallego, L.	418, 666	González de Chávarri, E.	514
García Molina, P.	541	González- Recio, O.	126
García S.	517	González, A.	289, 292
García, A.	18	González, D.	726
García, A.J.	418, 666	González, E.	550
García, C.B.	57	González, J.	325, 328
García, I.	469	González, J.S.	343, 349
García, L.	391	González, M.	211, 214, 220
García, M.L.	96, 114	González, M.J.	391
García, M.T de J.	469	González-Ortiz, G.	787
García, R.V.	663	González-Recio, O.	123
García, S.	481	González-Valero, L.	253, 259
García-Belenguer, S.	478	González-Villalobos, D.	708
García-Cachán, M.D.	490	Goyache, F.	87, 129, 131
García-Fernández, M.	27, 30	Gracia, M.I.	574
García-Gámez, E.	27, 30	Graus, J.	57
García-García, R.M.	687	Griebler, L.	511
García-Ispierto, I.	206, 645, 648, 651, 654, 657	Grilló, M.J.	197, 200
García-Marín, J.F.	197	Grimal, A.	42, 60
García-Nogales, P.	66	Grompone, M.A.	622
García-Rebollar, P.	217, 226	Guada, J.A.	313
García-Ruiz, A.I.	188		

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Guerra, V.	131	Juárez, M.	283, 628
Guerrero, J.	325, 328, 541	Jurado, J.J.	93, 678
Gumbao, D.	738	Juste, V.	631
Gutiérrez, J.P.	87, 129, 131	Kamoun, M.	343
Gutiérrez, S.	66	Keli, A.	313
Gutiérrez-Adán, A.	738	Khelil, H.	766
Gutiérrez-Gil, B.	27, 30, 51	Klandorf, H.	781
Habboul, M.	262	Klinder, A.	796
Harkiss, G.	200	Köhler, S.	167
Heredia-Nava, D.	361	Korhonen, T.	790
Hermes, R.G.	232, 235, 790	Laborda, P.	111
Hermida, M.	211, 220, 223, 226, 295	Lacasta, D.	152
Hernández, A.	550	Lachica, M.	253, 256, 259
Hernández, M.M.	197	Lafuente, M.A.	663
Hernández, P.	592, 631	Lago, N.	143, 194, 203
Hernández-Navarro, S.	663	Lahoz, B.	678
Hernández-Ortega, M.	361, 421	Láinez, M.	250, 442, 445
Hervás, G.	283, 364, 754	Landete, T.	418
Hervera, M.	787	Landete-Castillejos, T.	666
Hidalgo, C.O.	711	Lara, L.	253, 256
Horcada, A.	493, 589, 628	Latorre, M.A.	502, 574
Hotchkiss, A.T.	793	Lauzurica, S.	514, 637
Huerta, B.M.	421	Lavara, R.	96
Ibáñez, M.A.	188	Lavín, P.	391, 424
Iglesias, A.	295	Laviña, A.	21
Indurain, G.	535	Lázaro, R.	214, 217, 226, 238
Insausti, K.	535, 562, 595	Lemos, D.	481
Ipharraguerre, I.	337	López de Maturana, E.	84, 102
Isabel, B.	352, 538, 619	López, A.	541
Izquierdo, D.	684, 693	López, C.	143, 176, 194, 203
Izquierdo, M.	247, 451, 568	López, J.E.	418
Izquierdo, M.D.	699	López, L.	340
Jaime, I.	523	López, S.	164, 343, 349, 775
Jauregi, F.	535	López-Bote, C.	538, 547, 586, 619, 634
Jáuregui, P.	197	López-Campos, Ó.	349, 757
Jiménez de Bagüés, M.P.	167, 170	López-Carrasco, C.	487
Jiménez-Moreno, E.	262	López-Gatius, F.	206, 645, 648, 651, 654, 657
Jimeno, V.	286, 352	López-Parra, M.M.	625
Jordana, J.	24, 48, 134	López-Urueña, E.	675
Joy, M.	394, 397, 412, 553, 556	Lorenzo, L.	129

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Lorenzo, P.L.	277, 280, 687	Matás, C.	735
Lugnani, C.	613	Mateos, A.	547
Luján, L.	200	Mateos, G.G.	211, 214, 217, 220, 223, 226, 238, 262, 265, 499
Luna, C.	723	Maza, M.T.	607, 610
Lurueña-Martínez, M.A.	523	McCartney, A.L.	796
Macarulla, J.M.	388	Medel, I.	526, 529, 583, 601
Macías, A.	21	Mejía, W.	726
Madruga, C.	45	Melo, C.	15
Mainar-Jaime, R.C.	182, 185	Mendizábal, J.A.	535
Mainau, E.	448	Mendoza, N.	720
Mandaluniz, N.	430, 433	Mesías, F.J.	385
Manrique, E.	382, 403	Miguel, J.A.	367, 370
Manso, T.	286, 352	Millán P.	277, 280
Manteca, X.	448, 475, 478	Miranda, G.	481, 517, 520
Mantecón, A.R.	286, 349, 364, 391, 424,	Mitjana, O.	167, 170
Marchán, F.	277, 280	Mocé, E.	42, 96, 729, 732
Margüenda, I.	191	Mocé, M.L.	111, 729
María G.A.	481, 520, 517	Mochales, E.	155, 161, 173
Marletta, D.	63	Mogas, T.	699
Marmi, J.	48	MoliAlcaide, E.	763, 766
Marqués, M.	75	Molina, A.	108
Martí, S.	475	Molina-Alcaide, E.	304, 310, 316
Martín, E.	21	Molist, F.	232, 235, 790
Martínez, A.	54, 134, 418	Monge, P.	517, 520, 583
Martínez, G.	406, 409	Monteagudo, L.V.	21
Martínez, H.P.A.	421	Montejo, A.	535
Martínez, M.	442, 445	Montoro, C.	337
Martínez, M.E.	298, 301, 331, 760, 772	Morales, B.	726
Martínez, Y.	424	Morales, J.	619
Martínez-Fernández, A.	289, 340	Morales-Almaráz, E.	289, 292
Martínez-Giner, M.	72	Morat, R.	684
Martínez-Morentin, C.G.	191	Morato, R.	693, 699
Martínez-Pastor, F.	675	Moreno, C.	33, 81
Martínez-Royo, A.	678	Moreno, J.R.	631
Martínez-Sañudo, M.J.	57	Morrondo, P.	143, 158, 173, 176, 179, 203
Martínez-Valladares, M.	149	Moset, V.	250
Martín-García, A.I.	310	Moubi, R.	325, 328
Martín-Gil, J.	663	Moya, D.	307
Martín-Orué, S.M.	241, 790	Mozo-Martín, R.	741
Mata-Campuzano, M.	675		

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Muela, E.	520, 526, 529, 556, 583, 601, 604	Opsi, F.	343
Muelas, R.	114	Osorio, C.	625, 726
Muiño, R.	711, 714	Osorio-Meléndez, C. ...	708
Muiño-Blanco, T.	696, 717, 720, 723	Óvilo, C.	9, 12, 18, 69
Mula, P.	155, 158, 161	Padilla, J.A.	568
Muns, R.	241, 466	Painceira, A.	176, 203
Muñoz, G.	9	Palacio, J.	478
Muñoz, I.	105	Palacios, C.	523, 663
Muñoz, M.	9	Panadero, R.	143, 176, 203
Muñoz, R.	544	Panea, B.	493, 532, 553, 556, 589
Muriel, A.	454	Paniagua, M.	247, 451
Murillo, S.	21	Paramio, M.T.	684, 693, 699
Nafrarías, M.	334	Pardo, G.	622
Naya, H.	126	Pardos, L.	607, 610
Newbold, C.J.	304, 751, 763	Paredes, J.	415
Nicodemus, N.	188, 191, 277, 280	Parera, N.	238
Nicolás, M.	675	Parés, P.M.	48
Niesalla, H.	200	Pascual, M.	439, 481
Nieto, M.	69	Pato, F.J.	173, 176, 194
Nieto, R.	244	Pato, J.	143, 179, 203
Nieto, B.	87	Payeras, L.	129
Nistal, A.J.	669	Paz, A.	179
Nofrarías, M.	268	Paz, P.	675
Nogal, J.J.	164	Paz-Silva, A.	155, 158, 161
Nogal, R.	117	Peinado, J.	505, 508
Nogales, R.	310	Peiró, R.	117
Nogareda, C.	206, 645, 648, 651, 654	Pena, J.	123
Noguera, J.L.	6, 12, 72, 102	Pena, R.	6
Nudda, A.	616	Pena, R.N.	3, 72, 75, 78
Núñez-Romero, N.	217, 226	Peña, A.I.	711, 714
Ojeda, A.	63, 137	Peña, J.C.	457
Olaizola, A.M.	382	Peñalver, P.	631
Olguín, C.A.	418, 666	Pereira, E.	496, 598
Oliván, A.	583	Pérez de Muniain, A. ...	436
Olivares, A.	487, 586, 634	Pérez, C.	514, 637
Olivas, I.	250	Pérez, J.F.	232, 235, 241, 265, 790
Oliveira, F.	511	Pérez, J.J.	675
Oliveira, M.B.P.P.	640	Pérez, M.	200, 331
Oliver, L.	33	Pérez, V.	197
Olleta, J.L.	520, 556, 559, 604	Pérez-Cabal, M.A.	87

AUTORES	Páginas
Pérez-Calvo, E.	229
Pérez-Enciso, M.	63, 137
Pérez-Guzmán, M.D. ...	93
Pérez-Marín, D.	541
Pérez-Montarelo, D.	69
Pérez-Pardal, L.	129, 131
Pérez-Pé, R.	720, 723
Pérez-Serra, A.	54
Pflanzer, S.B.	577, 580
Picazo, R.	412
Piedrafita, J.	39, 45
Piles, M.	99
Pilla, F.	134
Pimienta, J.	550
Piquer, O.	250
Pirés, C.	511, 583
Pla, C.	54
Polvillo, O.	628
Polledo, L.	197
Ponz, R.	21
Prado, J.	161
Prieto, N.	757
Prieto, P.M.	415
Pulido, A.	385
Pulido, F.	385
Purroy, A.	562
Quintanilla, R.	3, 6, 15, 75
Quintero-Moreno, A.	708, 726
Rabanal, B.	754
Rafel, O.	99
Ragab, M.	117
Ralha, V.M.	358
Ramírez, H.	197, 200
Ramon, J.	99
Ramón, M.	93
Ramos, J.J.	152
Ramos, S.	63, 298, 301, 331, 760, 772
Ranilla, M.J.	298, 301, 331, 760, 772, 781
Rastall, R.A.	793
Rath, D.	681

AUTORES	Páginas
Rebollar, P.G.	214, 277, 280, 687
Reecy, J.M.	75
Reina, R.	197, 200
Reixach, J.	6, 120
Revilla, I.	523
Revilla, R.	36, 388, 412, 427
Reuelta, L.	687
Rey, A.I.	487, 586, 634
Rincón, C.	129, 131
Ripoll, G.	412, 493, 553, 556, 574, 589
Robina, A.	505
Rodellar, C.	36
Rodrigues, S.	496, 598
Rodríguez, E.	352
Rodríguez, A.	18
Rodríguez, M.C.	12, 18, 69
Rodríguez, M.L.	292
Rodríguez, R.	274
Rodríguez-López, J.M.	253, 259
Rodríguez-Romero, N.	274, 784
Rodríguez-Sánchez, J.A.	502, 574
Rojas-Cano, M.L.	253, 256
Rojas-Olivares, M.A.	460, 463
Rojo-Vázquez, F.A.	149
Romaguera, R.	684, 693
Román, T.	286
Romar, R.	690
Romasanta, A.	158
Romero, C.	188, 191
Romero, J.	424
Romero-Huelva, M.	310
Roncalés, P.	556, 571
Rosa, G.J.M.	126
Rosselló, M.A.	645
Rovira, J.	523
Royo, L.J.	129, 131
Rubio, J.	726
Rubio-Guillén, J.	708
Ruiz de la Torre, J.L.	478
Ruiz, J.	505
Ruiz, J.A.	481

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Ruiz, R.	379, 430, 433, 535, 672	Serrano, M.	93
Ruiz, S.	681, 735	Serrano, M.P.	211, 214, 217, 220, 223, 226, 238, 262, 499,
Ruíz-de-Arkaute, M.	152	Serrano, P.	439
Ruiz-de-la-Torre, J.L.	448	Sierra, I.	21
Salama, A.A.K.	460, 463	Silió, L.	9, 18, 69
Salari, S.	271	Silva, J.M.	472, 565
Saleh, K.	117	Silveira, E.T.F.	613
Salgado, C.	87	Silveira, V.C.P.	394, 397
San Primitivo, F.	30, 90, 51	Solanas, E.	793
San Román, B.	197	Sola-Oriol, D.	241, 265, 268, 466
Sánchez, C.I.	637	Soldado, A.	289, 340
Sánchez, J.	550	Solé, M.	6
Sánchez, J.A.	155, 158, 161	Soto E.C.	304, 766
Sánchez, J.P.	30, 51, 90	Suárez, J.L.	155, 158, 161, 173
Sánchez, M.	490, 505, 508, 514	Sueiro, S.	211, 214, 220, 223
Sánchez, P.	678	Suryani, D.	607
Sánchez-Andrade, R.	155, 158, 161, 179	Tamargo, C.	711
Sánchez-Vera, E.	361	Tarrés, J.	39
Sansegundo, M.	735	Teixeira, A.	400, 496, 598
Santacreu, M.A.	111, 114	Tejeda, J.F.	550
Santolaria, P.	206, 645, 648, 651, 654, 657	Tejedor, M.T.	21
Santos N.	364	Tejerina, D.	625
Santos, M.V.	511	Tejido, M.L.	298, 301, 331, 772, 760
Sanz, A.	36, 427, 660	Tena, B.	33
Sanz, E.	18, 508, 634	Terré, M.	355, 616
Sanz, Y.	749	Tomàs, A.	72
Sañudo, C.	493, 520, 526, 529, 559, 583, 589, 601, 604	Tomás, C.	729, 732
Saro C.	301, 331, 760, 772	Tor, M.	78, 120, 544
Sarriés, V.	562, 595	Toral, P.G.	283, 754
Scala, A.	155, 158	Toro M.A.	69
Secchi, S.	66	Torrallardona, D.	235
Segarra, A.	33	Torres, A.	250, 442, 445
Selaive, A.B.S.	400	Tusell, LL.	99
Sepúlveda, W.S.	607, 610	Ugarte, E.	123, 535
Serrano, A.	66, 454, 475, 778	Uriarte, J.	146, 152, 161, 176
Serrano, B.	206, 645, 648, 651, 654, 657	Urrutia, B.	24
Serrano, E.	723	Urruzola, N.	622
		Valderrábano, J.	146, 152
		Vale, A.P.	640

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Valencia, D.G.	238	Vilaró, F.	544
Valera, M.	108	Villadangos, B.	391
Vaquero, M.	514	Villagrà, A.	250
Vargas, J.E.	775	Villalba, D.	36, 379, 388, 672
Varona, L.	33, 81, 102, 108	Villanueva, M.	436
Vásquez-López, F.	403	Villarroel, M.	517
Vázquez, L.	143, 155, 173, 176, 179, 194, 203	Viña, M.	143, 194
Vázquez, M.A.	469	Virkola, R.	790
Vázquez, M.I.	705	Viudes de Castro, M.P.	42, 60, 729
Velarde, A.	475	Vivar-Quintana, A.M.	523
Viana, J.M.	295	Weigel, K.A.	126
Vicente, F.	289, 292	Wilches, D.	523
Vicente, J.G.	538	Wommer, T.P.	511
Vicente, J.S.	42, 96, 729	Yáñez Ruíz, D.R.	304, 316, 364, 763, 766, 775
Vicente-Mainar, F.	340	Yániz, J.L.	206, 645, 648, 651, 654, 657
Vico, J.P.	182, 185	Yoon, I.	307
Vidal, L.	469	Younis, H.	117
Vidal, O.	54, 134	Ywazaki, M.	232, 235, 790
Vieira e Brito, A.N.	406, 409, 472	Zaragoza, P.	36
Vieira, C.	490, 514	Zaraza, J.	681
Vieira, L.	735	Zidi, A.	15, 24
Vigil, E.	21	Zomeño, C.	592, 631
Viguera, J.	505, 508	Zudaire, G.	595
Vila, C.	164		

Genética

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES PORCINOS DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS (SLC27A / FATP *solute carrier family 27a*)

Gallardo, D.¹, Quintanilla, R.¹ y Pena, R.N.¹

¹Genética i Millora Animal, IRTA-Lleida, 25198 Lleida. david.gallardo@irta.cat

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos de cadena larga (LCFAs), además de ser metabolitos importantes de la homeostasis energética, poseen varias funciones celulares fundamentales, incluyendo la activación de factores de transcripción nuclear. No obstante, para poder tener efecto, los LCFAs deben traspasar la membrana plasmática, un proceso que puede ocurrir por difusión o por sistemas de transporte específicos mediados por proteínas. En este sentido las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs) forman parte de este tipo de proteínas de transmembrana cuya variabilidad puede alterar el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a las células, por lo que su identificación y caracterización puede resultar de gran interés. En humano y ratón los genes FATPs comprenden una familia de seis proteínas altamente homólogas presentes en prácticamente todos los tejidos del cuerpo. Sin embargo, en la especie porcina se dispone de poca información sobre esta familia. En la especie humana, las proteínas FATP presentan una cierta especificidad tisular, observándose como la proteína FATP1 es la mayoritaria en los tejidos adiposos (Schaffer y Lodish, 1994), si bien también se ha identificado en corazón y en músculo esquelético (Binnert et al., 2000, Hirsch et al., 1998, Schaffer y Lodish, 1994). En cuanto al gen FATP4 es el único FATP expresado en el intestino delgado y se localiza en el borde apical de las células epiteliales, siendo responsable de la absorción de los ácidos grasos de cadena larga procedentes de la dieta. También cabe destacar que FATP1 y FATP4 son los FATPs predominantes en el cerebro (Febbraio, et al. 1999). Por otra parte, un estudio de Meirhaeghe et al. (2000) ha identificado un polimorfismo en el intrón 8 del gen FATP1 asociado al aumento de los niveles de triglicéridos en plasma. El presente trabajo aborda el estudio molecular de los genes FATP1 y FATP4 con el objetivo de determinar si existen mutaciones en dichos genes que puedan afectar a la variabilidad de caracteres relacionados con el metabolismo lipídico en porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Amplificación parcial del cDNA FATP1 y FATP4 porcino

Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado correspondientes a 14 individuos de las razas Meishan (3), Large White (1), Landrace (2) y Duroc (8). La síntesis del cDNA se llevó a cabo mediante el kit Revert Aid MuMLV-RT (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un equipo de electroforesis capilar ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) empleando los oligos mFATP_F1; 5'-GAG CTG GCG ACA GAA CAA A-3' y mFATP_R1; 5'-AGC TGT CCG CTC ACC TCG-3' para el fragmento 1 del gen FATP1 (exón 1 a 3), mientras que se utilizaron los oligos FATP4_F2; 5'-TTC TAC ATC TAC ACG TCC GGC AC-3' y FATP4_R2; 5'-TTG AGG TAG CCG TCG AAG C-3' (exón 5 a 10) y FATP4_F3; 5'-TGG TGG GCA CCA TCG TCC-3' y FATP4_R3; 5'-GGA CTT GGG GCA AAT CAC AG-3' (exón 10 a 13) para los fragmentos 2 y 3 del gen FATP4. Todos los oligonucleótidos empleados fueron diseñados mediante el software Primer Express 2.0 usando como referencia las secuencias porcinas NM_001083931 para el gen FATP1 y las secuencias trace (gn|t|470929409, 448054674, 448055756, 470951804, 1380786935 y 1377108472) para el gen FATP4. La composición de la reacción de PCR para los distintos fragmentos fue: 2 mM MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 0.3 μM de cada primer, 0.5 μl de reacción de transcripción reversa y 1 U de Taq DNA polimerasa (5'Prime) en un volumen final de 25 μl, a excepción del fragmento 1 del gen FATP1 cuya concentración de primers fue de 0.4 μM y del fragmento 2 del gen FATP4 cuya concentración de MgCl₂ fue de 2.5 mM. En todos los casos el perfil térmico fue de un ciclo a 95 °C-5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C-20 seg, 55 °C-20 seg, 72 °C-40 seg, seguido de una extensión final a 72 °C-5 min, a excepción del fragmento 1 del gen FATP1 donde se utilizó una Tm de 52 °C. Finalmente, se utilizó el programa Clustalw para realizar el alineamiento de las secuencias permitiendo la identificación de SNPs.

Genotipado del FATP1c.491C>T del exón 2 del gen FATP1

Se ha puesto a punto la técnica de PCR-RFLP para genotipar el SNP1 del gen FATP1 en la población Duroc objeto de estudio en aproximadamente 330 individuos. Los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación fueron: FATP1_SNP1_FW; 5'-TCT CCG TGT TGA TCC GTG T-3' y FATP1_SNP1_RV; 5'-CAC TGC CAG CTC CTC TCC-3', obteniendo una banda de 389 pares de bases. Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados mediante el software Primer Express 2.0 usando como molde la secuencia porcina de FATP1 (NM_001083931). La composición de la reacción de PCR fue: 1 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.2 μM de cada primer, 50 ng de ADN genómico y 0.3 U de Taq DNA polimerasa (5'Prime) en un volumen final de 15 μl. El perfil térmico fue de un ciclo a 95 °C-5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C-20 seg, 64 °C-20 seg, 72 °C-40 seg y una extensión final a 72 °C-5 min. Posteriormente, se utilizó el enzima de restricción XagI para realizar el genotipado de las muestras.

Genotipado del FATP4c.1882C>G (Leu→Val) del exón 13 del gen FATP4

Se han utilizado los oligonucleótidos FATP4_SNP3_F; 5'-CAG AAG ACA GAC CTG CGG AA-3' y FATP4_SNP3_R; 5'-CGG TCT CAG TCT CAG CCT GG-3') para amplificar un fragmento de 402 pares de bases. La composición de la reacción de amplificación fue: 0.75 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.3 μM de cada primer, 25 ng de ADN genómico y 0.3 U de Taq DNA polimerasa (5'Prime) en un volumen final de 15 μl. El perfil térmico consistió en un ciclo a 95 °C-5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C-20 seg, 60 °C-30 seg, 72 °C-30 seg y una extensión final a 72 °C-5 min. Se utilizó el enzima de restricción MspA1I para realizar el genotipado de las muestras.

Análisis de asociación para los ácidos grasos en músculo y para los niveles de lípidos plasmáticos

A partir de los genotipos disponibles para los animales de la población Duroc, se ha realizando un análisis preliminar de asociación del FATP1c.491C>T con las concentraciones de lípidos séricos (colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos) y la composición en ácidos grasos de la grasa intramuscular de los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius*. El modelo utilizado para el análisis fue el siguiente: $y_i = \mu + \text{lote}_i + \beta \text{cov}_i + g_j + e_{ij}$ donde: y_i es el fenotipo analizado; lote_i es el efecto fijo lote de engorde, cov_i es una covariable (grasa dorsal para las medidas de colesterol sérico y grasa intramuscular para el contenido en ácidos grasos) y g_j es el efecto del genotipo para el polimorfismo analizado del gen FATP1. Para todos los fenotipos se calcularon las medias mínimo-cuadráticas de cada uno de los genotipos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar las secuencias de los distintos individuos analizados se han identificado tres SNPs, dos de los cuales se localizan en el gen FATP4 y uno en el gen FATP1. Todos los SNPs identificados a excepción del FATP4c.1882C>G son silenciosos, por lo que los resultados preliminares obtenidos deben interpretarse con cautela. En cuanto a los resultados del genotipado del FATP4c.1882C>G, todos los individuos analizados resultaron homocigotos CC, por lo que no se ha podido realizar un estudio de asociación. El análisis de asociación del FATP1c.491C>T (Tabla 1) ha revelado relaciones significativas con los niveles séricos de lipoproteínas LDL, así como con el contenido en ácidos grasos saturados en ambos músculos. En este sentido, tanto en el músculo *longissimus dorsi* como en *gluteus medius* se ha observado una asociación significativa de este polimorfismo con el contenido en ácido esteárico de la grasa intramuscular, presentando los individuos heterocigotos una mayor concentración de este ácido. El contenido en ácido palmítico presenta una tendencia similar, si bien no llega a alcanzar la significación estadística. Actualmente se está optimizando un protocolo de qPCR para estudiar la expresión de los genes FATP1-6 en distintos tejidos con la finalidad de caracterizar su patrón de expresión. Además, también se está realizando el mapeo RH para localizar las posiciones de estos 6 genes en el genoma porcino.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado mediante el proyecto *Mapeo e identificación de genes implicados en el metabolismo lipídico en porcino, la calidad de la carne y la calidad del jamón curado* (AGL2007-66707-C02-02). Agradecemos a Selección Batallé la generación del material animal, a David Almuzara su apoyo técnico y a Isabel Díaz la realización de los análisis de calidad de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Binnert, C., Koistinen, H.A., Martin, G., Andreelli, F., Beetling, P., Koivisto, V.A., Laville, M., Auwerx, J., Vidal, H. 2000. *Am. J. Physiol.* 279: 1072–1079. • Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., Silverstein, R.L. 1999. *J. Biol. Chem.* 274: 19055–19062 • Hirsch, D., Stahl, A., Lodish, H.F. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 8625–8629. • Meirhaeghe, A., Martin, G., Nemoto, M., Deeb, S., Cottel, D., Auwerx, J., Amouyel, P., Helbecque, N. 2000. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1330–1334. • Schaffer, J.E., Lodish, H.F. 1994. *Cell.* 79: 427–436.

Tabla 1. LSmeans de los niveles de ácidos grasos de los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* para los distintos genotipos del *FATP1c.491C>T* del gen *FATP1*.

	<i>longissimus dorsi</i>				<i>gluteus medius</i>	
	N	LDL	C18:0	SAT	C18:0	SAT
TT	30	57.18 ^{A*}	11.26 ^A	36.52 ^{AB}	10.93 ^{AB}	36.18 ^{AB}
TC	162	61.55 ^{AB}	11.81 ^B	37.24 ^B	11.32 ^B	36.61 ^B
CC	137	65.94 ^B	11.60 ^{AB}	36.70 ^A	10.97 ^A	36.06 ^A

(*) superíndices distintos indican diferencias significativas $P < 0.05$

CHARACTERIZATION OF THE PORCINE FATTY ACID TRANSPORT PROTEINS (SLC27a / FATPs solute carrier family 27a)

ABSTRACT: Long-chain fatty acids (LCFAs) contribute to many cellular functions including energy homeostasis and activation of nuclear transcription factors. However, to perform their diverse effects, LCFAs have first to traverse the plasma membrane, a process that can occur either through diffusion or be mediated by proteins. Fatty acid transport proteins (FATPs solute carrier family 27) are integral transmembrane proteins that enhance the uptake of long-chain fatty acids into cells. Although in humans six highly homologous FATPs proteins are found in practically all tissues, in the porcine species that information is limited. With the aim to increase the knowledge of these genes in pigs, different approaches have been followed. First, three partial fragments of *FATP1* and *FATP4* genes have been amplified and sequenced. Subsequently, we have used the clustalw software to identified polymorphisms in the porcine sequence. And finally, a preliminary association study was conducted identifying a polymorphism (*FATP1c.491C>T*) of *FATP1* gene with significant effects in the relative distribution of stearic and saturated fatty acid levels in *longissimus dorsi* and *gluteus medius* muscles.

Keywords: *fatty acid transport proteins, FATP, solute carrier family 27a, pig*

ESTUDIO DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA CANTIDAD Y COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR DE LOS MÚSCULOS *LONGISSIMUS DORSI* Y *GLUTEUS MEDIUS* EN UNA POBLACIÓN DUROC

Solé, M.¹, Pena, R.¹, Amills, M.², Cánovas, A.¹, Gallardo, D.², Reixach, J.⁴, Díaz, I.³, Noguera, J.L.¹ y Quintanilla, R.¹

¹IRTA Genètica i Millora Animal (Lleida) marina.sole@irta.cat; ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona; ³IRTA Tecnologia dels Aliments;

⁴Selección Batallé SA

INTRODUCCIÓN

La cantidad y composición de la grasa intramuscular (GIM) son caracteres determinantes de las características organolépticas y tecnológicas de la carne (Regueiro y Díaz, 1994). Este hecho, unido a la relación existente entre la composición grasa de la carne y la salud humana, ha despertado un creciente interés por estos caracteres. En este sentido el músculo *Longissimus dorsi*, caracterizado por un alto contenido en fibras de tipo IIB glucolíticas, ha sido el más ampliamente estudiado y utilizado como indicador en estudios de calidad de la carne en porcino. El músculo *Gluteus medius* presenta una composición fibrilar similar a la del músculo *Longissimus dorsi*, si bien algunos estudios en diversas razas de porcino han mostrado perfiles metabólicos diferentes entre ambos músculos (Essen-Gustavson y Fjelkner-Modig, 1985).

En el presente trabajo se aborda el estudio de los genes relacionados con el contenido y la composición de la grasa intramuscular de los músculos *Longissimus dorsi* (LD) y *Gluteus medius* (GM) en una población Duroc caracterizada por un alto contenido de grasa intramuscular mediante un análisis conjunto de QTL y de expresión génica diferencial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal, registros fenotípicos y genotipado de los individuos. El material animal procede de una población de 350 individuos castrados pertenecientes a una línea comercial Duroc y distribuidos en cinco familias de medio-hermanos paternos. Todos los individuos fueron genotipados para 110 microsatélites distribuidos por todo el genoma (Gallardo et al., 2008). Se tomaron muestras de los músculos LD y GM al sacrificio (190 d de edad, 122 kg de peso vivo). En ambos músculos se midió el porcentaje de GIM, el contenido en colesterol y la composición de ácidos grasos (C:12-C:22).

Análisis de QTL. El barrido genómico para la detección de QTL se realizó mediante la aproximación descrita por Knott et al. (1996) para el análisis de familias de medio hermanos. El modelo de análisis incluía los efectos lote o día de sacrificio y las covariadas espesor de grasa dorsal (para GIM) o GIM (para el porcentaje de ácidos grasos). Los niveles de significación a nivel genómico se establecieron mediante corrección de Bonferroni.

Experimento de microarrays. El diseño del experimento de microarrays se realizó seleccionando a los animales extremos (grupo Alto y grupo Bajo) para un índice derivado del primer componente principal que incluye diversos parámetros relacionados con el metabolismo lipídico (lípidos plasmáticos, nivel de engrasamiento y grasa intramuscular y perfil de ácidos grasos). De estos animales, se procesaron 70 muestras del músculo GM (35 por grupo) y 20 del músculo LD (10 por grupo). El RNA de las muestras se extrajo y purificó con el kit RiboPure™ (Ambion), realizando posteriormente una hibridación no competitiva con el chip *GeneChip Porcine Genome Array (Affymetrix)*. La corrección del *background* y la normalización de los datos se realizaron mediante el algoritmo gcRMA.

Análisis de los datos de expresión génica. El análisis de los datos de expresión se realizó mediante las herramientas BRB-Array Tools (Xu et al, 2008) y GEAMM (Casellas et al. 2007). En ambos casos se analizó la expresión diferencial entre músculos y entre grupos con alto y bajo nivel de metabolismo lipídico mediante un único análisis con toda la información disponible. Posteriormente se realizó un análisis ontológico para clasificar desde una perspectiva funcional los genes diferencialmente expresados, utilizando el paquete de herramientas bioinformáticas DAVID (Huang et al., 2009; en <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Finalmente se realizó una búsqueda de genes diferencialmente expresados en los intervalos

de confianza de los QTL detectados, utilizando la aplicación para el alineamiento de los elementos *Affymetrix* incluida en Pig QTL DataBase (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los QTL significativos a nivel genómico detectados para la cantidad y el perfil de ácidos grasos de la GIM de los músculos GM y LD. En general existe cierta consistencia con QTL detectados en otros estudios (e.g. Sánchez et al. 2007). No obstante cabe destacar la escasa correspondencia entre las asociaciones observadas en ambos músculos, resultado que sugiere diferencias en cuanto a la determinación genética de estos caracteres en LD y GM. Para el músculo GM se observan QTL relevantes para el %GIM en los cromosomas 3 y 7. El cromosoma 7 en particular parece desempeñar un papel importante en la variabilidad genética de la GIM del músculo GM mostrando, además de las asociaciones descritas, varios QTL significativos a nivel cromosómico (no descritos en el presente trabajo) para el perfil de ácidos grasos. Para el músculo LD por su parte, el cromosoma 6 y el cromosoma 12, este último con un importante efecto sobre la cantidad total de ácidos grasos saturados, son los que parecen tener mayor relevancia.

Los resultados obtenidos en el estudio de expresión diferencial de mRNA (Tabla 2) muestran un total de 292 genes (correspondientes a 350 sondas) diferencialmente expresados entre músculos, resultado que estaría en consonancia con la posición diferencial de los QTL descritos en los músculos analizados. Para todos estos genes el cociente entre las expresiones medias mostraba una tasa superior al 20% de sobre/infraexpresión en uno de los músculos, si bien el rango llega hasta el 800% (caso del gen HOXA10). En un 66% (196 genes) de los casos se trata de sondas sobreexpresadas en LD, si bien tan solo 23 de estas sondas (17 genes) superaron el 50% de sobreexpresión, mientras que 55 sondas (43 genes) superaron dicha tasa para la sobreexpresión en GM.

Entre los grupos de individuos con niveles extremos para diversos caracteres del metabolismo lipídico (Tabla 2) se obtuvo un número muy superior de genes diferencialmente expresados (579 sondas correspondientes a 459 genes), pero el rango para las tasas de sobre/infraexpresión fue considerablemente menor. De acuerdo con lo observado previamente por Cánovas et al. (2008) al analizar los niveles de expresión mRNA en GM, hubo un claro predominio de los genes sobreexpresados en el grupo de animales con valores elevados de parámetros relacionados con el metabolismo lipídico. Cabe destacar que tan solo 35 genes demostraron expresión diferencial simultáneamente para ambos efectos, músculo y grupo. Asimismo el estudio ontológico mostró diferencias funcionales entre ambos grupos de genes.

Por último el estudio de concordancia posicional entre las sondas diferencialmente expresadas entre grupos / músculos y los QTL detectados nos permitió elaborar una lista de genes candidatos (Tabla 3) que podrían presentar una asociación estructural y funcional con la cantidad y composición de la grasa intramuscular de los músculos LD y GM en porcino. De entre ellos cabe destacar el gen GPD1, relacionado con el incremento en la producción de triacilglicerol en el tejido adiposo de los humanos obesos, o los genes NPC1 y NPC2, que codifican para una proteína relacionada con la captación de colesterol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cánovas et al. 2008. 3rd Internat. Symposium on Animal Functional Genomics (Edimburgo)
- Casellas et al. 2008. *Anim Genet* 39:89
- Essen-Gustavson & Fjelkner-Modig 1985. *Meat Sci* 13:33
- Gallardo et al. 2008. *Physiol Genom* 35:199
- Huang et al. 2009. *Nat Protoc.* 4:44
- Knott et al. 1996. *Theor Appl Genet* 93:7180
- Regueiro & Díaz 1994. *Irtacam*
- Sanchez et al. 2007. *BMC Genetics* 8:55
- Xu et al. 2008. *Bioinformatics* 24:137.

Tabla 1. Principales QTL relacionados con la cantidad y composición de la grasa intramuscular (GIM) de los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*.

<i>gluteus medius</i>				<i>longissimus dorsi</i>			
SSC	Carácter	F-value	Posición	SSC	Carácter	F-value	Posición
3	%GIM	12.64*	15cM	3	%GIM	10.24+	53cM
3	%Vaccénico	12.95*	15cM	6	%Vaccénico	14.56*	95cM
5	%Mirístico	13.98*	94cM	6	Colesterol(mg/g)	16.57**	35cM
7	%GIM	16.48**	133cM	12	%SAT	13.31*	74cM
7	%Vaccénico	17.60**	81cM	14	%Esteárico	12.28*	85cM
18	%Palmítico	15.67**	39cM				
18	%SAT ^a	14.46*	40cM				

^a Porcentaje de ácidos grasos saturados

* p<0.05; **p<0.01 a nivel genómico

Tabla 2. Genes con expresión diferencial entre los dos músculos y los dos grupos con alto y bajo nivel de metabolismo lipídico

	Nº Sondas (Genes) ^A	Sobreexpresados grupo 1	Sobreexpresados grupo 2	Rango Cociente Expresiones
MÚSCULO	350 (292)	GM 119 (96)	LD 231 (196)	0.32-8.84
GRUPO	579 (459)	Alto 459 (376)	Bajo 120 (83)	0.43-2.76

^A Nº de Sondas (Genes) que cumplieron los requisitos p<0.001, FDR < 0.01 y FoldChange >1.2 o <0.8. (Resultados con BRB-array Tools)

Tabla 3. Genes con expresión diferencial entre grupos con alto y bajo metabolismo lipídico y concordancia posicional con los QTL detectados.

SSC (posición QTL)	Banda citogenética porcina	Banda citogenética Humana	Genes candidatos
3 (15cM)	chr.3 (0-33 cM)	chr.7 (63-102 cM)	GNAI2
3 (53cM)	chr.3 (33-76 cM)	chr.16 (0-31 cM); chr.2 (50-114 cM)	RRN3; IK
5 (94cM)	chr.5 (88-118 cM)	chr.12 (0-105 cM)	MRLC2 ^a GPD1 MKNR1 ^a SP1 ^a TAF9
6 (95cM)	chr.6 (84-107 cM)	chr.1 (11-40 cM); chr.18 (0-40 cM)	OXCT1; NPC1 AQP4
6 (35cM)	chr.6 (0-53 cM)	chr.16 (56-89 cM)	SERF1A
7 (133cM)	chr.7 (100-137 cM)	chr.14 (72-92 cM)	NPC2
7 (81cM)	chr.7 (74-100 cM)	chr.15 (31-95 cM); chr.14 (18-73 cM)	TCF12 ^a IDH1; MYH10 ^a PRPF39
12 (74cM)	chr.12 (56-89 cM)	chr.17 (31-65 cM)	GALNT1 ^a COASY PKCNT1
14 (85cM)	chr.14 (80-101 cM)	chr.10 (118-130 cM)	TIAL1 ^a BAG3 LYRM2 ALDOC
18 (40cM)	chr.18 (27-50 cM)	chr.7 (25-120 cM)	GNAI2 COASY

^a El subíndice denota los genes diferencialmente expresados entre Músculos.

Agradecimientos: Este proyecto ha sido financiado por el MICINN (AGL2007-66707-C02-01 y GEN2003-20658-C05-05). Agradecemos a Selección Batallé su cooperación en la obtención del material animal y a D. Almuzara su apoyo técnico. M. Solé es beneficiaria de una beca FPI del MICINN.

STUDY OF GENES INVOLVED IN THE INTRAMUSCULAR FAT CONTENT AND COMPOSITION OF MUSCLES *LONGISSIMUS DORSI* AND *GLUTEUS MEDIUS* IN A DUROC POPULATION

ABSTRACT: The intramuscular fat (IMF) content and composition are key traits in organoleptic, technological and nutritional quality of meat. We have conducted a study of genes influencing these traits in pigs by two approaches: QTL and expression analyses. The animal material consisted on 350 barrows of a commercial Duroc line, distributed in 5 half-sib families. The percentage of IMF, cholesterol content and fatty acid composition were determined in *Longissimus dorsi* and *Gluteus medius* muscles. A gene expression analysis of individuals with extreme values for several parameters related with lipid metabolism and fat meat characteristics was carried out in these two muscles by RNA hybridization in the *GeneChip Porcine Genome Array (Affymetrix)*. All individuals were genotyped for 110 microsatellites distributed across the 18 autosomes. Several genome-wide significant QTL with effects on %IMF and several fatty acid profile have been detected at SSC 3, 6, 7, 12, 14 and 18. Moreover, we have detected 350 genes differentially expressed between the two analysed muscles, along with 579 genes differentially expressed in the two groups of animals with high and low levels of lipid metabolism. A list of potential candidate genes has been elaborated from genes differentially expressed and located in the confidence intervals of detected QTL.

Keywords: intramuscular fat, QTL, gene expression, candidate gene

DOS MEJOR QUE UNO: INTERACCIÓN DE POLIMORFISMOS *RBP4-Mspl* y *ESR1-PvuII* SOBRE EL TAMAÑO DE CAMADA EN UNA LÍNEA PORCINA CHINO-EUROPEA

Muñoz, M.¹, Ovilo, C., Muñoz, G., Fernández, A., Alves, E. y Silió L.

¹Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra. A Coruña km 7,5, 28040 Madrid
E-mail: mariamm@inia.es

INTRODUCCIÓN

Más de 20 polimorfismos (SNP) han sido descritos en genes porcinos con influencia sobre el tamaño de camada o sus componentes fisiológicos (Distl, 2007). Las compañías de mejora comienzan a utilizar en la selección de sus líneas maternas tests genéticos basados generalmente en algunos de estos polimorfismos (*ESR1*, *PRLR*, *RBP4* y *FSHB*) con efectos de sustitución alélica comprendidos entre 0,25 y 1 lechón por camada (Rothschild, 2004). Sin embargo, ninguno de estos SNP corresponde a la mutación causal, por lo que sus efectos son inconsistentes entre las distintas razas y líneas genéticas. Por ello, su empleo efectivo como herramienta de selección de una determinada línea requiere realizar comprobaciones adicionales. El objetivo del presente trabajo fue la evaluación en la línea Tai zumu de los efectos sobre el tamaño de camada de dos de estos polimorfismos (*RBP4-Mspl* y *ESR1-PvuII*) así como su posible interacción.

MATERIAL Y MÉTODOS

La línea Tai zumu fue obtenida por la empresa de genética porcina GENE+ a partir de la inseminación de cerdas Meishan y Jiaying con verracos Large White hiperprolíficos, y posterior selección para crecimiento magro de la progenie a lo largo de nueve generaciones (Milan et al., 2003). En este trabajo se han utilizado los registros del número de lechones nacidos vivos en camadas obtenidas de cerdas genotipadas para los polimorfismos *RBP4-Mspl* y *ESR1-PvuII*. Previamente se realizó una búsqueda de nuevos SNP del gen *RBP4* en su cDNA y en un fragmento de DNA genómico de 553 pb, que incluye los exones 2, 3 y 4 y por tanto la probable posición del polimorfismo intrónico *RBP4-Mspl* (Rothschild et al., 2000). Para la amplificación del cDNA, se diseñaron dos parejas de cebadores a partir de la secuencia publicada de mRNA porcino (GenBank, NM_214057). La amplificación del fragmento de DNA genómico se llevó a cabo mediante el protocolo de Rothschild et al. (2000). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones en un secuenciador automático ABI 3730. Las secuencias fueron editadas y alineadas con el paquete informático Winstar. Para el genotipado del polimorfismo *RBP4-Mspl* (c.248+106C>G) se utilizó el protocolo de Rothschild et al. (2000). El genotipado del SNP *ESR1-PvuII* se realizó en un trabajo previo (Muñoz et al., 2007) mediante el protocolo de Short et al. (1997). Para el análisis de asociación, los registros de tamaño de camada de los dos primeros partos (NV₁₂) y del tercero y posteriores (NV₃₊) se consideraron caracteres genéticamente distintos ($\gamma_G = 0,54$). Se utilizó un modelo animal bivariado con efecto permanente, en el que como efectos sistemáticos figuran los efectos de granja-año-estación, ordinal de parto, tipo genético (Tai zumu o Landrace) del padre de la camada, y -en su versión más completa- los efectos aditivo y dominante de los polimorfismos analizados y la interacción aditiva x aditiva entre ambos. Los valores de las variables indicadoras de los efectos aditivos ($\alpha = 0, 1, 2$), dominantes ($\delta = 0, 1$) y de la interacción aditiva x aditiva ($\psi = 0, 1, 2$ y 4) son función del número de copias alélicas recibidas de cada SNP por cada cerda. La significación estadística de los efectos se calculó comparando los correspondientes modelos completo y reducido mediante la aproximación χ^2 al cociente de verosimilitudes (LR). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa QxPak (Pérez Enciso y Misztal, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la secuenciación y alineamiento del fragmento del gen *RBP4* amplificado a partir de DNA genómico, se detectaron en Tai zumu cinco SNP intrónicos: c.110+47C>T, c.248+15T>G, c.248+16G>A, c.248+27A>T y c.248+106C>G, éste último coincidente con el *RBP4-Mspl* (Rothschild et al., 2000), y un SNP silente en el tercer exón: c.156A>G. El

alineamiento de secuencias de cDNA confirmó la presencia de este SNP silente, pero no se detectaron otros polimorfismos exónicos. Tres de los SNPs intrónicos y el SNP exónico cosegregan con el *RBP4-MspI* (c.248+106C>G). El cuarto SNP (c.248+27A>T) resultó poco informativo, por lo que se desestimó el genotipado de nuevos polimorfismos de este gen. El genotipado del SNP *RBP4-MspI* en 534 cerdas madres de 2.000 camadas permitió identificar 142 cerdas GG, 261 GC y 131 CC, siendo 0,51 la frecuencia del alelo G y 0,49 la del alelo C. En cuanto al SNP *ESR1-PvuII*, su distribución de genotipos en 403 cerdas madres de 1.667 camadas fue la siguiente: 56 AA, 180 AB y 167 BB, con frecuencias 0,36 del alelo A y 0,64 del alelo B. El número medio de nacidos vivos fue 12,8 lechones en los dos primeros partos (NV_{12}) y 12,9 en los partos tercero y posteriores (NV_{3+}), con 957 y 1.043 registros respectivos. Los efectos aditivos y dominantes obtenidos en los análisis independientes de los dos SNP se presentan en la Tabla 1. Se ha detectado un efecto significativo del alelo *RBP4-MspI* G de +0,42 lechones en los dos primeros partos, pero que no se mantiene en los partos posteriores. No se encontraron efectos aditivos significativos del SNP *ESR1-PvuII*, ni ningún efecto dominante.

Tabla 1. Efectos aditivos* y dominantes de los SNP *RBP4-MspI* y *ESR1-PvuII* sobre nacidos vivos por camada (NV_{12} y NV_{3+}) estimados en análisis separados de ambos genes

	<i>RBP4-MspI</i>		<i>ESR1-PvuII</i>	
	Aditivo \pm SE	Dominante \pm SE	Aditivo \pm SE	Dominante \pm SE
NV_{12}				
Efecto, lechones	0,42 \pm 0,18	-0,17 \pm 0,25	-0,06 \pm 0,30	-0,14 \pm 0,39
Prob = 0	0,016	0,449	0,840	1,000
NV_{3+}				
Efecto, lechones	0,03 \pm 0,19	-0,01 \pm 0,26	0,03 \pm 0,30	0,06 \pm 0,40
Prob = 0	0,899	0,934	0,920	1,000

* efectos de sustitución de *RBP4-MspI* C por *RBP4-MspI* G y de *ESR1-PvuII* A por *ESR1-PvuII* B

El análisis conjunto de los efectos de los dos SNP se realizó sobre una muestra de 1.533 registros de camadas nacidas de las 375 cerdas genotipadas para ambos genes. En un análisis preliminar con el modelo completo se confirmó la no significación de los efectos dominantes. Los resultados obtenidos con un modelo reducido a los efectos aditivos de los SNP y sus interacciones, se presentan en la Tabla 2. Para NV_{12} no se observó interacción significativa entre ambos genes siendo similares los resultados a los obtenidos en los análisis por separado, si bien afectados por el menor tamaño de muestra. El resultado más notable es la significativa interacción de los efectos aditivos de ambos SNP sobre NV_{3+} (LR = 4,831; $P = 0,028$), que indica que a partir del tercer parto el efecto del SNP *RBP4-MspI* es dependiente del *ESR1-PvuII*. Los genotipos más prolíficos fueron las combinaciones homocigóticas [*RBP4-MspI*;GG/ *ESR1-PvuII*;AA] y [*RBP4-MspI*;CC/ *ESR1-PvuII*;BB], y los genotipos menos prolíficos las combinaciones alternativas de homocigotos [*RBP4-MspI*;GG/ *ESR1-PvuII*;BB] y [*RBP4-MspI*;CC/ *ESR1-PvuII*;AA] (Figura 1).

Tabla 2. Efectos aditivos* e interacción aditiva de los SNP *RBP4-MspI* y *ESR1-PvuII* sobre nacidos vivos por camada (NV_{12} y NV_{3+}) estimados en el análisis conjunto de ambos genes

	<i>RBP4-MspI</i>	<i>ESR1-PvuII</i>	Interacción \pm SE
	Aditivo \pm SE	Aditivo \pm SE	
NV_{12}			
Efecto, lechones	0,44 \pm 0,43	-0,21 \pm 0,40	0,11 \pm 0,30
Prob = 0	0,302	0,603	0,701
NV_{3+}			
Efecto, lechones	0,79 \pm 0,41	0,73 \pm 0,39	-0,61 \pm 0,29
Prob = 0	0,050	0,059	0,028

* efectos de sustitución de *RBP4-MspI* C por *RBP4-MspI* G y de *ESR1-PvuII* A por *ESR1-PvuII* B

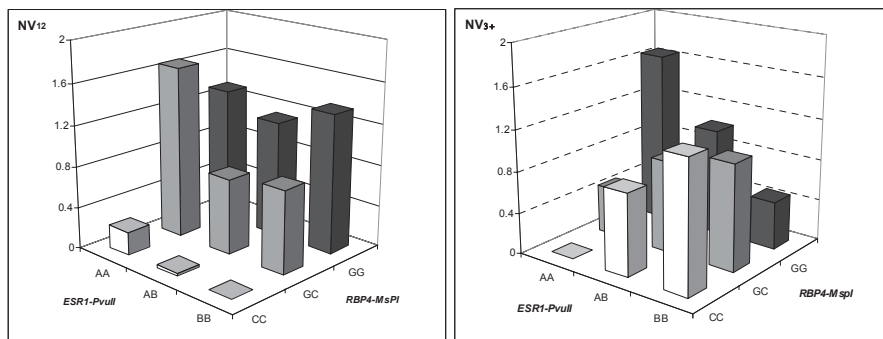


Figura 1. Interacción entre genotipos *RBP4-MspI* y *ESR1-PvuII* sobre nacidos vivos por camada en los dos primeros partos (NV_{12}) y partos tercero y posteriores (NV_{3+})

Un resultado similar ha sido descrito por Gonçalves et al. (2008) en una línea comercial brasileña que -como Tai zumu- incluye cerdos de razas Chinas entre sus ascendientes. Aunque pudiera plantearse la utilización del SNP *RBP4-MspI* para la mejora de la prolificidad en los dos primeros partos, a la vista de la interacción detectada en los partos posteriores, la selección conjunta para ambos genotipos sería notablemente más eficiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Distl, O. 2007. *Reprod. Domest. Anim.* 42 Suppl 2: 10-6.
- Milan, D., Demeure, O., Laval, G., Lannuccelli, N., Genet, C., Bonnet, M., Burgaud, G., Riquet, J., Gasnier, C & Bidanel, J.P. 2003. *J. Rech. Porc.* 35: 309-316.
- Muñoz, G., Óvilo, C., Estellè, J., Silió, L., Fernández, A. & Rodriguez, C. 2007. *Gen. Sel. Evol.* 39: 195-206.
- Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2004. *Bioinf.* 20: 2792-2798.
- Rothschild, M.F., Messer, L., Day, A., Wales, R., Short, T., Southwood, O. & Plastow G. 2000. *Mamm. Genome.* 11(1):75-77.
- Rothschild, M.F., 2004. *Genet. Res.* 83: 1-6.
- Short, T.H., Rothschild, M.F., Southwood, O.I., McLaren, D.G., de Vries, A., van der Steen, H., Eckardt, G.R., Tuggle, C.K., Helm, J., Vaske, D.A., Mileham, A.J. & Plastow, G.S. 1997. *J. Anim. Sci.* 75: 3138-3142.
- Gonçalves, I.D.V, Gonçalves, P.B.D., Silva, J.C., Portela, Jr V.V., Borges, L.F.K., Oliveira, J.F.C. & Lovatto, P.A. 2008. *Genet. Mol. Biol.* 31: 481-486.

Agradecimientos: Agradecemos a F. Flamarique y M. Sourdioux (GENE +) su amable colaboración para facilitarnos registros y muestras biológicas.

INTERACTION BETWEEN *RBP4-MspI* AND *ESR1-PvuII* POLYMORPHISMS ON LITTER SIZE IN A CHINESE EUROPEAN PIG LINE

ABSTRACT: Pig breeding companies have implemented some genetic tests based on SNP of genes with influence on litter size. However these SNP are not the causative mutations and additional verifications would be required to use them as a tool for the selection of prolific pigs. The objective of this study was the evaluation of the effects and the potential interaction of *RBP4-MspI* and *ESR1-PvuII* SNPs on litter size in the Tai-zumu Chinese European line. Association analysis was performed considering the records of live born piglets from the two first parities (NV_{12}) and those from the third and later parities (NV_{3+}) as different traits. The *RBP4-MspI* G allele was found significantly associated with NV_{12} (0.42 ± 0.18 piglets), but significant effects on litter size were not found for *ESR1-PvuII*. A significant additive interaction between both SNP on NV_{3+} was detected in the joint analysis. The most prolific sows were the [*RBP4-MspI*;GG/ *ESR1-PvuII*;AA] and [*RBP4-MspI*;CC/ *ESR1-PvuII*;BB] genotypes. Therefore, combined selection of both favorable genotypes should be particularly recommended for improving litter size persistency in this line.

Keywords: pig, litter size, genetic tests, additive interaction

ANÁLISIS DE DOS QTL EPISTÁTICOS EN EL CROMOSOMA 12 PORCINO PARA EL CARÁCTER TAMAÑO DE CAMADA

Fernández-Rodríguez, A.¹, Rodríguez, M.C., Noguera, J.L., Balcells, I., Óvilo, C. y Fernández, A.I.

¹Dpto.Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid. E-mail: Amanda@inia.es

INTRODUCCIÓN

Varios estudios de detección de QTL para los caracteres número de lechones nacidos totales (NT) y nacidos vivos (NV) han mostrado resultados significativos en regiones cromosómicas de SSC 7, 12, 14, 17 y SSC 7, 11, 16 y 18, respectivamente (Tribout et al., 2008). Además, varios genes candidato relacionados con este tipo de caracteres han sido analizados hasta el momento, como son el receptor de *estrógenos 1 (ESR1)* y la *proteína de unión al retinol (RBP4)*, en los que se han detectado polimorfismos asociados con el carácter NV (Tribout et al., 2008).

En un estudio llevado a cabo en un cruce experimental tipo F₂ Ibérico x Meishan, se ha mostrado la complejidad de estos caracteres detectando varios QTL y múltiples interacciones epistáticas entre ellos en los cromosomas porcinos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 18 (Noguera et al., 2009). Entre los resultados más relevantes, se han detectado dos QTL epistáticos en el cromosoma 12 para NV y NT. El objetivo de este trabajo ha sido confirmar estos dos QTL epistáticos mediante la incorporación de nuevos marcadores y analizar dos genes previamente seleccionados como candidatos posicionales y biológicos (*SLC9A3R1* y *NOS2a*) (Fernández et al., 2007).

MATERIAL Y MÉTODOS

El material animal utilizado en este trabajo corresponde al mismo cruce experimental F₂ Ibérico x Meishan (Rodríguez et al., 2006). El registro de caracteres reproductivos se realizó en 255 cerdas de la F₂, obteniendo un total de 865 partos con registros para NV y 881 para NT, datos recopilados durante cuatro partos sucesivos. En el quinto parto las cerdas fueron sacrificadas a los 30 días de gestación y se tomaron muestras de tejido ovárico.

Se genotiparon 12 marcadores en todo el cruce: 7 microsatélites (*SW2490*, *SW2494*, *SW1307*, *SW874*, *SW1956*, *S0106* y *SWR1021*) usados previamente por Noguera y col. (2009), 3 nuevos microsatélites (*SWR1802*, *S0090* y *SW1962*), y dos marcadores PCR-RFLP (*GH (Hha I)* y *FASN (Msp I)*) (Rodríguez et al., 2006). El mapa de ligamiento se construyó utilizando el programa CRI-MAP versión 2.4 (Green et al., 1990).

La caracterización de los genes *SLC9A3R1* y *NOS2a* se ha abordado a partir de ARNm. Las muestras de ovario almacenadas a -80°C se procesaron con el kit RiboPure™ para la extracción de ARN total. La síntesis de ADNc se llevó a cabo mediante retrotranscripción inversa (Superscript™ II Reverse Transcriptase). Se caracterizaron 1970 pb del ADNc *SLC9A3R1* porcino y 3948pb del *NOS2a*, incluyendo las regiones 3' y 5' UTR, y se realizó una búsqueda de polimorfismos mediante secuenciación.

Análisis estadísticos: Se realizó un análisis de detección de QTL para los caracteres NV y NT, incluyendo como efectos fijos el año-estación, el ordinal de parto, el efecto poligénico aleatorio y el efecto ambiental permanente, además de los efectos aditivo y dominante del QTL. Para analizar la epistasia se incluyeron los efectos de la interacción. Los umbrales de significación cromosómicos se calcularon al 0.1, 1 y 5%. El estudio de asociación de ambos genes candidato con los caracteres de prolificidad se realizó mediante un modelo animal estándar y un test de asociación asistida por marcadores (MAAT). En ambos se incluyó el efecto de sustitución alélica de cada SNP, y los efectos fijos anteriormente nombrados. Además, en el MAAT se incluyeron los efectos aditivo y dominante del QTL. Por último se testó la interacción entre los polimorfismos de mayor significación. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa QxPak v.3 (Pérez-Enciso y Miształ, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mapa de ligamiento obtenido resultó: FASN- 0.9 - SW2490 - 10.4 - SW2494 - 29.4 - GH - 3.4 - SW1307 - 16.7 - SW874 - 8.5 - SWR1802 - 3.1 - S0090 - 2.0 - SW1956 - 5.0 - SW1962 - 8.8 - S0106 - 15.5 - SWR1021, concordante con mapas públicos disponibles.

La detección de QTL con estos 12 marcadores reveló la presencia de dos QTL sugestivos en SSC12 para NV y NT que se tornaron significativos cuando se testó la interacción epistática (QTL1 a 15cM y QTL2 a 97cM), siendo aditivo x aditivo la interacción más significativa ($p < 0.0005$ para NV y $p < 0.0006$ para NT). Estos resultados confirman lo detectado previamente por Noguera et al. (2009) pero con un mayor poder estadístico y significación debido a la incorporación de 5 nuevos marcadores.

En un trabajo previo se seleccionaron por su posición, el gen *SLC9A3R1* (7.4cM) para el QTL1 y el *NOS2a* (94.2) para el QTL2, de entre una propuesta inicial de cinco genes candidato posicionales y biológicos. *SLC9A3R1* interviene en la respuesta primaria a estrógenos (Tracy et al., 2002), mientras que *NOS2a* codifica para una óxido nítrico sintasa inducible que está implicada en la regresión de los tejidos reproductivos en mamíferos (Yong et al., 2004). Mutaciones en ambos genes han sido relacionadas con disminución del tamaño de camada en ratones (Senollikar et al., 2002; Burnett et al., 2002). Además se ha descrito una interacción entre las proteínas codificadas por ambos genes necesaria para la correcta localización celular del *NOS2a* (Glynnne et al., 2002).

En el presente trabajo llevamos a cabo la caracterización completa del ADNc de ambos genes. Por comparación de secuencias entre 10 individuos de la F_2 detectamos un total de 9 polimorfismos en *SLC9A3R1* y 14 en *NOS2a*. Para seleccionar los polimorfismos más interesantes a genotipar analizamos su importancia biológica. Un total de 6 polimorfismos fueron genotipados: 3 SNPs (c.662A>G, c.1791A>C, c.2192C>T) y una duplicación c.3556_3571 dup CTGTATTACCTGAC en *NOS2a* y 2 SNPs en *SLC9A3R1* (c.839A>G y c.1359A>G). El SNP c.2192C>T y la duplicación cosegregaron en el cruce.

Los resultados significativos del modelo animal estándar para los dos genes con los caracteres NV y NT figuran en la Tabla 1. Para NV, los 3 polimorfismos de *NOS2a* tuvieron efectos aditivos significativos sobre el carácter, mientras que para *SLC9A3R1* sólo el SNP c.1359A>G mostró efectos significativos. En el caso del carácter NT sólo los SNPs *SLC9A3R1* c.1359A>G y *NOS2a* c.2192C>T, presentaron efectos significativos.

Con el objetivo de reducir el riesgo de falsos positivos que se produce en cruces F_2 , debido al desequilibrio de ligamiento, se llevó a cabo un MAAT en el que se incluyeron los efectos del QTL y del gen candidato (Tabla 2). Para ello, se ha seleccionado de cada gen el polimorfismo que mostró mayor significación estadística con el modelo animal estándar: *SLC9A3R1* c.1359A>G y *NOS2a* c.2192C>T. En primer lugar se incluyó el efecto de los QTL1 y 2 en el modelo para testar el efecto de los polimorfismos. Los resultados fueron similares a los del modelo animal, excepto para *SLC9A3R1* c.1359A>G donde el efecto sobre NV no fue significativo ($p=0.051$). Posteriormente se incluyeron los efectos de los dos SNPs en el modelo, con el fin de testar cada uno de los QTL para los dos caracteres. Cuando *SLC9A3R1* c.1359A>G fue incluido, el QTL1 para NT desapareció. En el caso del carácter NV, la significación del QTL1 disminuyó de forma menos acusada, en concordancia con el resultado anterior. En el caso de *NOS2a*, cuando se incluyó el efecto del SNP c.2192C>T en el modelo, la significación del QTL2 para ambos caracteres desapareció completamente. Dado que ambos QTL son significativos únicamente cuando se contempla epistasia en el modelo, se analizó la interacción entre ambos SNPs, sin ser ésta significativa. Estos resultados nos indican que el efecto de la interacción de los dos polimorfismos no es subyacente al efecto epistático de los QTL.

La duplicación de 15pb del 3'UTR de *NOS2a* que cosegrega con el SNP c.2192C>T parece constituir parte de una diana para microRNA, además esta región del gen incluye varios elementos ricos en AU (AREs), regiones que intervienen en la regulación postranscripcional mediante la unión de ribonucleoproteínas nucleares. Estas potenciales explicaciones de causalidad junto con los resultados aportados por el MAAT parecen mostrar a *NOS2a* c.3556_3571 dup CTGTATTACCTGAC como una probable mutación causal, aunque análisis funcionales de esta mutación serían necesarios para confirmar esta causalidad.

Tabla 1. Resultados significativos del análisis de asociación con el modelo animal estándar.

Gen	SNP	NV			NT		
		p Nominal	a (SE)	d (SE)	p Nominal	a (SE)	d (SE)
SLC9A3R1	c.1359A>G	0,042	0,55 (0,22)	0,45 (0,28)	0,031	0,58 (0,23)	0,47 (0,29)
	c.662A>G	0,022	0,56 (0,24)	-	-	-	-
NOS2a	c.1791A>C	0,041	- 0,37 (0,18)	-	-	-	-
	c.2192C>T*	0,016	- 0,43 (0,18)	-	0,018	- 0,42 (0,18)	-

Tabla 2. Resultados del MAAT con los polimorfismos de mayor significación.

Gen	SNP	Carácter	QTL			SNP		
			cM	P nominal	QTLa (SE)	P nominal	a (SE)	d (SE)
SLC9A3R1	c.1359A>G	NV	78	0,056	0,36 (0,19)	0,051	0,53 (0,22)	0,44 (0,28)
		NT	78	0,047	0,38 (0,19)	0,035	0,57 (0,23)	0,46 (0,29)
NOS2a	c.2192C>T*	NV	14	0,016	0,45 (0,18)	0,012	-0,31 (0,18)	-
		NT	0	0,044	0,37 (0,19)	0,023	-0,41 (0,18)	-

* Formando haplotipo con la duplicación de 15pb del NOS2a 3' UTR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burnett, T.G., Tash, J.S. & Hunt, J.S., *Reprod.* 2002. 124:49-57. • Ediger, T.R., Park, S. & Katzenellenbogen B.S. 2002. *Mol Endocrinol* 16:1828-1839. • Fernández, A., Fernández, A.I., Rodríguez, C., Tomas, A., Estellé, J., Noguera, J.L. & Óvilo, C. 2007. *ITEA Vol 28, II* • Glynn, P., Darling, K., Picot, J. & Evans, T. 2002. *J. of Biol Chem* 36:33132-33138. • Green, P.I., Falls, K. & Crooks, S. 1990. Washington University. • Noguera, J.L., Rodríguez, M.C., Varona, L., Tomás, A., Muñoz, G., Ramírez, O., Barragán, C., Arqué, M., Bidanel, J.P., Amills, M., Óvilo, C. & Sánchez, A. 2009 (enviado a *Genetics*). • Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2004. *Bioinformatics*, 20:2792-8. • Rodríguez, M.C., Tomas, A., Alves, E., Ramirez, O., Arqué, M., Muñoz, G., Barragán, C., Varona, L., Silió, L., Amills, M. & Noguera, J.L. 2006. *Anim Genet* 36, 490-496. • Tao, Y., Fu, Z., Zhang, M., Xia, G., Yang, J. & Xie, H. 2004. *Mol Cell Endocrinol* 222:93-103. • Tribout, T., Lannuccelli, N., Druet, T., Gilbert, H., Riquet, J., Gueblez, R., Mercat, M.J., Bidanel, J.P., Milan, D. & Le Roy, P. 2008. *Genet. Sel. Evol.* 40:61-78. • Shenolikar, S., Voltz, J.W., Minkoff, C.M., Wade, J.B. & Weinman, E.J. 2002. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11470-5

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto AGL2004-08368. Amanda Fernandez-Rodríguez disfruta de una beca INIA.

DETECTION AND ANALYSIS OF TWO EPISTATIC QUANTITATIVE TRAIT LOCI ON SSC12 AFFECTING LITTER SIZE IN PIGS

ABSTRACT: The aim of the present study was to confirm the previously detected epistatic QTL on SSC12 for total number of piglets born (TNB) and number of piglets born alive (NBA) in a Meishan x Iberian F₂ intercross. A chromosome scan with 12 markers allowed us to confirm the two epistatic QTL (QTL1 at 15cM and QTL2 at 97cM). Besides, *SLC9A3R1* and *NOS2a* were analysed as biological and positional candidate genes underlying these QTL. Both cDNAs were characterized and 23 polymorphisms were identified in the F₂. Five polymorphisms were tested: two in *SLC9A3R1* for QTL1 and four in *NOS2a* for QTL2. Only *SLC9A3R1*c.1359A>G reported significant effects on TNB and NBA, while the three SNPs of *NOS2a* showed significant additive effects on both traits. Marker assisted association test performed with the most significant SNPs (*SLC9A3R1* c.1359A>G and *NOS2a* c.2192C>T) reported significant results for both SNPs; however the interaction between them was not significant. Despite of the negative result of the interaction, statistical and biological evidences show *NOS2a* c.3556_3571dupCTGTATTACCTGAC, cosegregating with c.2192C>T, as a likely causal mutation of the epistatic effect.

Keywords: epistatic effect, litter size, *SLC9A3R1*, *NOS2a*

ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES DE LA APOLIPOPROTEÍNA D (*APOD*) Y *LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 12 (LRP12)* PORCINOS

Melo, C.¹, Zidi, A.¹, Quintanilla, R.² y Amills, M.¹

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Bellaterra 08193 (Carola Melo: Carola.Melo@uab.cat). ² IRTA Genètica i Millora Animal, 25198 Lleida.

INTRODUCCIÓN

La realización de un barrido genómico para caracteres relacionados con el metabolismo lipídico en una población Duroc (Gallardo et al., 2008) reveló la existencia de dos QTL significativos para las concentraciones séricas de triglicéridos a 190 días (SSC4, 43 cM) y de lipoproteínas de alta densidad (HDL) a 45 días (SSC13, 63 cM). En el presente trabajo se ha abordado la caracterización molecular de los genes candidatos *low density lipoprotein receptor-related protein 12 (LRP12)* y apolipoproteína D (*APOD*) que están comprendidos en los intervalos de confianza de los QTL SSC4 y SSC13, respectivamente. La *APOD* es una glicoproteína perteneciente a la familia de las lipocaínas (Drayna et al., 1986) y forma parte de las lipoproteínas de alta densidad (Mc Conathy et al., 1973), esencialmente vinculadas al transporte reverso de colesterol desde los tejidos hasta el hígado. La *APOD* se expresa de forma ubicua, aunque los niveles de expresión son particularmente elevados en los tejidos adiposo, conectivo y nervioso (Unigene Database). En humano, el gen *APOD* ha sido secuenciado en su totalidad y mapeado en el cromosoma 3q26.2qter (Strausberg et al., 2002). En el gen *APOD* humano se ha detectado tres sustituciones no sinónimas que presentan asociaciones con distintos parámetros relacionados con el metabolismo lipídico (Desai et al., 2002). En cuanto a la *LRP12*, es un miembro de la familia de receptores de moléculas LDL cuya función principal consiste en captar el colesterol circulante en plasma (Blacklow et al., 2007). El gen *LRP12* está localizado en el cromosoma humano 8q22 y codifica una proteína de 859 aminoácidos (<http://www.ensembl.org>).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las extracciones de RNA se realizaron a partir de muestras de músculo estriado esquelético correspondiente a 8 individuos de la raza Duroc. Dichos individuos se escogieron en función de dos criterios (a) Pertenecer a la familia en la que segrega el QTL analizado y (b) Haber heredado alelos alternativos para dicho QTL (50% de los individuos portadores de cada uno de los alelos). Las muestras de tejido se congelaron en nitrógeno líquido, fueron homogenizadas con un politrón y el RNA se purificó mediante el preparado Trizol (Invitrogen). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante transcripción reversa (RT) con el kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En el caso del gen *APOD*, los cebadores empleados en la reacción de amplificación fueron *APOD*-Fw; 5'-TCT CCA GCC ACC CAG CCC-3', *APOD*-Rv; 5'- CAG CAG GTC AGC AGC AAG TTT ATT-3', *APO*_Rv_intern_Sec; 5' TTT AGT GAG TAG TTG GCT TGG ATG-3'. Las condiciones de PCR fueron 1 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0.2 μM de cada cebador, 1 U de Taq DNA polimerasa (Eco Taq) y 2 μl de reacción RT en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico fue de 94°C-1 min, 61°C-1 min, 72°C-2 min durante 30 ciclos.

En el caso del gen *LRP12*, los cebadores empleados en la reacción de amplificación fueron:

Fragmento 1: *LRP12*_Fw1; 5'- CTC CTC CTC TCT CCC TCC ATC-3' y *LRP12*_Rv1; 5'- ACA TAA TCA CCA TAA CCA GTA CCA TC-3'

Fragmento 2: *LRP12*_Fw2; 5'- TTC TCC CAA TTA TCC AGA CTT TTA T-3' y *LRP12*_Rv2; 5'-GGT GGA ATT AAA CCC TGA GC-3'

Fragmento 3: *LRP12*_Fw3; 5'- GCT TTA TTC TCT GAG AAT GTT TGA A-3' y *LRP12*_Rv3; 5'-GGT CTG GAG CAG TCA TTC AC-3'

Fragmento 4: LRP12_Fw4; 5'- TGG GTA CGT TTT ACA TTA GGG C-3' y LRP12_Rv4; 5'- GTT ACA AGA TGT ACT GGC AAA AGC-3'

Las condiciones de amplificación fueron 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.5 μM de cada cebador, 0.625 U de Taq DNA polimerasa (Taq Gold) y 2 μl de reacción RT en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico fue de 40 ciclos a 94°C-30 seg, 64°C-1 min, 72°C-1.30 min para el fragmento 1; 94°C-30 seg, 59°C-1 min, 72°C-1.30 min para el fragmento 2 y 94°C-30 seg, 61°C-1 min, 72°C-1.30 min para los fragmentos 3 y 4.

Los productos amplificados *APOD* y *LRP12* se secuenciaron utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) y un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730 Applied Biosystems)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se amplificó una región de 794 pb del gen *APOD* porcino que abarca la totalidad de la región codificante. Dicha secuencia presentaba una similitud nucleotídica del 93%, 92%, 85% y 77% con las secuencias ortólogas de bovino, humano, ciervo y ratón. El análisis de la secuencia aminoacídica mediante el programa Scan Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>) reveló la existencia de un dominio funcional lipocalina. Este dominio es característico de proteínas transportadoras de pequeñas moléculas hidrofóbicas como esteroides, retinoides y lípidos (Flower et al. 1993). El alineamiento de las distintas secuencias *APOD* porcinas generadas en el presente trabajo no permitió detectar ninguna posición polimórfica.

En cuanto al gen *LRP12* porcino, se amplificó una región de 2937 pb empleando cuatro pares de oligonucleótidos. El alineamiento de las 8 secuencias obtenidas mediante el programa Multalin permitió construir una secuencia consenso. Dicha secuencia fue comparada mediante el programa Blast con las secuencias de genes ortólogos en otras especies, presentando una similitud nucleotídica del 96% y 92% con humano y ratón. La secuencia aminoacídica *LRP12* porcina fue analizada mediante el programa Scan Prosite. Cabe destacar que se detectaron cinco dominios *LDL-receptor class A*, ricos en cisteínas y típicos de los receptores de LDL. Asimismo, se hallaron cuatro polimorfismos nucleotídicos (SNP) sinónimos C516T, C771T, A780G y A1110G en la región codificante. Los SNP C516T, C771T, y A780G están localizados en el exón 4, mientras que A1110G se halla en el exón 5. Un objetivo futuro consistirá en realizar análisis de asociación entre dichos SNP y distintos caracteres vinculados al metabolismo lipídico con un especial énfasis en aquellos relacionados con las concentraciones séricas de lípidos

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado mediante los proyectos AGL2002-04271-C03 y AGL2007-66707-C02 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Nuestro agradecimiento a la empresa Selecció Batallé por su inestimable contribución en la generación del material animal. Carola Melo ha recibido una beca otorgada por el Instituto Agronómico Mediterraneo de Zaragoza (IAMZ) y el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blacklow, S.C. 2007. Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 419-426.
- Desai, P.P., Bunker, C.H., Ukoli, F.A., Kamboh, M.I. 2002. Genetic variation in the apolipoprotein D gene among African blacks and its significance in lipid metabolism. *Atherosclerosis.* 163: 329-38.
- Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., Wion, K., Lawn, R. 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* 261: 16535-16539.
- Flowe, D.R., North A.C.T., Attwood T.K. 1993. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci.* 2: 753-761.
- Gallardo, D., Pena, R., Amills, M., Varona, L., Ramírez, O., Reixach, J., Díaz, I.,

Tibau, J., Soler, J., Prat, J., Noguera, J. L., Quintanilla, R. 2008. Mapping of quantitative trait loci for cholesterol, LDL, HDL and triglyceride serum concentrations in pigs. *Physiological Genomics*. 35: 199-209. • Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 16899-16903

MOLECULAR ANALYSIS OF THE APOLIPOPROTEÍN D (*APOD*) AND LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 12 (*LRP12*) GENES IN PIGS

ABSTRACT: In this work, we have characterized the variability of the low density lipoprotein receptor-related protein 12 (*LRP12*) and apolipoprotein D (*APOD*) genes in pigs. The porcine *LRP12* and *APOD* genes map to a QTL on SSC4 influencing serum triglyceride concentration at 190 days and to a SSC13 QTL with effects on high density lipoprotein (HDL) serum levels at 45 days, respectively. Sequencing of the coding region of pig *LRP12* showed that it encodes a protein with five cysteine-rich LDL-receptor class A domains that are typical of molecules binding LDL. We have also found four synonymous mutations at C516T, C771T, A780G and A1110G. Analysis of the pig *APOD* amino acid sequence evidenced the existence of a lipocalin domain typical of proteins binding small hydrophobic molecules. So far, we have not found any polymorphism in the pig *APOD* gene.

Keywords: *LRP12*, *APOD*, pig, lipid, quantitative trait locus

ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO c.2002C>T DEL GEN DEL RECEPTOR DE LEPTINA Y EL CONSUMO VOLUNTARIO DE PIENSO EN CERDOS DUROC x IBÉRICO

Rodríguez, M.C.¹, Carrasco, C., Fernández, A., García, A., Carabias, A., Sanz, E.,
Rodríguez, A, de Mercado, E., Silió, L. y Ovilo, C.

¹Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra. A Coruña km 7,5, 28040 Madrid
E-mail: valdo@inia.es

INTRODUCCIÓN

La leptina (LEP) tiene un papel importante en el control del consumo de alimento y la regulación del peso corporal en diferentes especies de mamíferos. Sus efectos sobre la saciedad están mediatizados por el Receptor de leptina, cuyo correspondiente gen (*LEPR*) es considerado un buen candidato para explicar parcialmente la variación en estos caracteres. Este gen es asimismo un candidato posicional en cerdos, dada su localización en el cromosoma 6 coincidente con un QTL con efecto sobre medidas de engrasamiento detectado en varios trabajos (Ovilo et al., 2005; Mohrman et al., 2006, Edwards et al., 2008). Muñoz et al. (2009) han asociado una sustitución nucleotídica en el gen *LEPR* (c.2002C>T) al crecimiento y espesor de grasa dorsal en dos cruces experimentales F2, con Ibérico y Landrace e Ibérico y Meishan como razas parentales. Sin embargo, el efecto directo sobre el consumo de pienso de esta mutación -que origina un cambio aminoacídico (Leu663Phe)- no ha sido estudiado hasta ahora. El presente trabajo aborda este estudio como su principal objetivo, así como la influencia de esta mutación sobre otros caracteres productivos y de calidad de carne y grasa en cerdos comerciales Duroc x Ibérico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se dispuso de 117 cerdos (60 machos y 57 hembras) nacidos de 31 madres Ibéricas y 8 verracos de raza Duroc en una granja de la empresa Julián Martín SA. Los lechones se identificaron al destete mediante implantación de transpondedores electrónicos inyectados en la cavidad abdominal. Una vez castrados los animales fueron transportados al Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL en Hontalbilla (Segovia), donde fueron alojados en grupos de tres animales del mismo sexo y genotipo del polimorfismo *LEPR* c.2002C>T, ocupando un total de 39 departamentos donde dispusieron de pienso *ad libitum*. El genotipado de este polimorfismo se realizó mediante un protocolo de pirosecuenciación ya descrito (Ovilo et al., 2005). Cada dos semanas se registró el consumo de pienso por departamento y el crecimiento individual de los cerdos del ensayo. Asimismo, el día previo a su sacrificio se registró el peso y el espesor de grasa en tres localizaciones. El despiece de los animales se realizó en el matadero de Mozarbez (Salamanca) donde se obtuvieron medidas de calidad de canal y muestras de lomo y grasa subcutánea de la región sacra. En la Estación Tecnológica de la Carne de Guijuelo se determinaron parámetros relacionados con calidad de carne (composición química, pérdidas por cocinado y resistencia al corte) y de grasa (perfil de ácidos grasos en intramuscular y subcutánea). Para el análisis de los registros de consumo de pienso por grupo se utilizó un modelo estadístico de efectos fijos $\bar{y} = \text{Sexo} + \text{COVa}(\text{LEPR}) + \text{COVd}(\text{LEPR}) + \text{COV}(\text{Peso medio}) + e$, en el que \bar{y} representa el consumo medio por grupo, los efectos aditivo (*a*) y dominante (*d*) del gen *LEPR* se contemplan como coeficientes de regresión de dos covariables indicadoras cuyos valores son función del número de copias del alelo *LEPR* c.2002T. Los diferentes datos individuales se analizaron mediante un modelo animal del tipo $y = \text{Sexo} + \text{COVa}(\text{LEPR}) + \text{COV}(\text{Edad} / \text{Peso} / \text{P. Canal}) + \text{Animal} + e$, en el que la segunda covariable tiene en cuenta los efectos de edad, peso vivo o peso canal, de acuerdo con el carácter analizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La función hipotalámica de la proteína *LEPR* es dependiente del nivel de LEP circulante, y éste de la magnitud del tejido adiposo. Por ello, el efecto sobre el consumo de alimento de una alteración de *LEPR* puede ser distinto en las diferentes fases de crecimiento y engrasamiento de los cerdos de engorde. En el presente análisis hemos distinguido tres

etapas de creciente engrasamiento a lo largo del engorde: inicial (de 35 a 65 kg), intermedia (65 a 105 kg) y final (105 a 160 kg).

Tabla 1. Efectos aditivo (*a*) y dominante (*d*) del SNP *LEPR* c.2002C>T sobre el consumo voluntario[†] de pienso en sucesivas etapas del crecimiento de cerdos Duroc x Ibérico

	Período de crecimiento		
	35 - 65 kg	65 - 105 kg	105 - 160 kg
Consumo medio (SD), kg	2.30 (0.52)	3.47 (0.39)	3.88 (0.42)
<i>a</i> ± SE, kg	0.03 ± 0.04 ^{NS}	0.21 ± 0.05***	0.41 ± 0.07***
<i>d</i> ± SE, kg	-0.03 ± 0.06 ^{NS}	-0.12 ± 0.06 ^{NS}	-0.08 ± 0.09 ^{NS}
Consumo (SD), g/kg ^{0.75}	128 (15)	129 (12)	103 (14)
<i>a</i> ± SE, g/kg ^{0.75}	0.75 ± 3.05 ^{NS}	7.60 ± 1.89***	9.04 ± 2.03***
<i>d</i> ± SE, g/kg ^{0.75}	-0.38 ± 3.89 ^{NS}	-5.02 ± 2.41*	-2.32 ± 2.59 ^{NS}

[†] Consumo por departamento expresado en kg y en g por kg de peso metabólico (= Peso Vivo^{0.75}).

Conforme a lo esperado, se observó un efecto positivo del alelo *LEPR* c.2002T sobre el consumo de pienso, estadísticamente significativo excepto en la etapa inicial, siendo su magnitud en la etapa final del engorde equivalente al 10.5% de la media del carácter. No se observaron efectos dominantes significativos. En la Tabla 1, se incluyen asimismo los efectos *a* y *d* sobre el consumo de pienso expresado en relación al peso metabólico de los animales.

Tabla 2. Efectos aditivos (*a*) del SNP *LEPR* c.2002C>T sobre crecimiento, espesor de grasa en diferentes localizaciones y rendimiento de piezas nobles en cerdos Duroc x Ibérico

Carácter	Media (SD)	<i>a</i> ± SE	Carácter	Media (SD)	<i>a</i> ± SE
GMD, g/d	836 (73)	46 ± 11 ***	Lomos, kg	5.4 (0.7)	-0.4 ± 0.1***
Peso Final, kg	158 (14)	5.1 ± 2.1 *	Paletas, kg	15.2 (1.4)	-0.8 ± 0.1***
P. Canal, kg	127 (12)	4.2 ± 1.8 *	Palet. fin sal, kg	14.6 (1.3)	-0.7 ± 0.1***
EG1 [†] , cm	4.8 (0.9)	0.5 ± 0.1 ***	Jamones, kg	25.3 (2.2)	-1.0 ± 0.2***
EG2, cm	4.9 (0.8)	0.5 ± 0.1 ***	Jam. fin sal, kg	24.5 (2.0)	-0.8 ± 0.2***
EG3, cm	4.9 (0.7)	0.4 ± 0.1 ***	Lomos, % /PC	4.3 (0.5)	-0.3 ± 0.1***
EG P2, cm	6.1 (1.0)	0.6 ± 0.1 ***	Paletas, % /PC	12.3 (0.9)	-0.7 ± 0.1***
EG C, mm	7.8 (1.2)	0.8 ± 0.1 ***	Jamones, % /PC	20.6 (1.3)	-0.8 ± 0.1***

[†] Medidas de espesor de grasa en vivo (EG1, EG2 y EG3) y en canal (EG P2 y EG C)

En cerdos, existe una importante variación en apetito en condiciones *ad libitum* entre razas, líneas seleccionadas y sexos. En general esta variación está asociada a efectos sobre la composición de la canal y la calidad de carne. Los animales de mayor consumo de pienso son también más grasos y de mejor calidad de carne que aquellos de menor apetito (Wood, 1989). Conforme a ello, en el presente estudio observamos que al importante efecto positivo del alelo c.2002T sobre el apetito van asociados efectos sobre crecimiento y espesor de grasa (Tabla 2), así como sobre diversos parámetros de calidad de carne determinados en *m. longissimus*: mayor contenido en GIM, menores pérdidas por cocinado y mayor terneza (Tabla 3). El efecto sobre el engrasamiento se corresponde con un incremento significativo de los ácidos grasos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) tanto en grasa intramuscular como subcutánea, que se traduce en un aumento del porcentaje de los ácidos saturados (SFA) y la disminución del porcentaje de mono (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) (Tabla 3). En cuanto a los resultados de rendimiento en piezas nobles, debe notarse que tanto los porcentajes como los pesos de las diferentes piezas están corregidos por el peso de la canal. A igual peso, las canales más grasas tienden a dar menor rendimiento tanto en piezas magras como en lomos, jamones y paletas recortados. Ello puede explicar los efectos

asociados al alelo c.2002T del gen *LEPR*, que se atenúan al considerar el peso de las piezas al finalizar el proceso de salado e inicio de la curación. Todos estos resultados indican la posible utilidad de un test genético basado en este SNP para reducir la heterogeneidad de los productos de cerdos cruzados Duroc x Ibérico.

Tabla 3. Efectos aditivos (a) del SNP *LEPR* c.2002C>T sobre caracteres de calidad de carne y porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA), mono (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) en grasa intramuscular y subcutánea en cerdos Duroc x Ibérico

Calidad Carne	Media (SD)	a ± SE	Calidad Grasa	Media (SD)	a ± SE
<i>m. longissimus</i>			G. Intramuscular		
GIM, %	9.4 (3.1)	1.5 ± 0.4***	SFA	39.2 (2.7)	1.2 ± 0.4 **
Proteína, %	21.1 (1.0)	-0.7 ± 0.1***	MUFA	55.2 (2.3)	-0.6 ± 0.4 ^{NS}
Humedad (%)	69.1 (2.4)	-0.7 ± 0.3 *	PUFA	5.6 (1.0)	-0.6 ± 0.1***
Pérdidas por Cocinado, %			G. Subcutánea		
	17.6 (2.9)	-1.2 ± 0.4 **	SFA	36.2 (1.6)	0.9 ± 0.2***
Resistencia al Corte, kg	4.2 (0.8)	-0.3 ± 0.1 **	MUFA	53.6 (1.4)	-0.6 ± 0.2 **
			PUFA	10.1 (0.9)	-0.3 ± 0.1 *

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Edwards, D.B., Ernst, C.W. et al. 2008. *J. Anim. Sci.* 86: 254-266. • Mohrman et al. 2003. *Anim. Genet.* 37: 435-433. • Muñoz, G., Ovilo, C., Silió, L., Tomás, A., Noguera, J.L. & Rodríguez, M.C. 2009. *J. Anim. Sci.* 87: 459-468. • Óvilo, C., Fernández, A., Noguera, J.L., Barragán, C., Letón, C., Rodríguez, M.C., Mercadé, E., Alves, E., Folch, J.M., Varona, L., & Toro, M.A. 2005. *Genet. Res.* 85: 57-67. • Wood, J.D. 1989. *BSAP Occasional Publication* nº 13, BSAP; Edimburgo.

Agradecimientos: Este trabajo está enmarcado dentro de un proyecto de investigación financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI-20060241), la Agencia de Inversiones y Servicios de la Junta de Castilla y León (ADE 04/07/SA/009) y el Ministerio de Industria Turismo y Comercio (FIT-060000-2007-69). Agradecemos la colaboración del personal de Julián Martín SL y la Estación Tecnológica de la Carne de Guijuelo, así como la asistencia técnica de Nines López y Rita Benítez.

ASSOCIATION BETWEEN THE *LEPR* c.2002C>T POLYMORPHISM AND VOLUNTARY FOOD INTAKE IN DUROC X IBERIAN PIGS

ABSTRACT: The leptin receptor gene (*LEPR*) is implicated in the regulation of voluntary feed intake in mammals. A missense mutation in exon 14 of the *LEPR* gene has been associated to growth and backfat thickness in two experimental pig crosses. The effect of this mutation (c.2002C>T) on the appetite of 117 commercial Duroc x Iberian pigs was evaluated in this study. The results evidenced remarkable additive effects of the *LEPR* c.2002T allele on the voluntary food intake from 65 to 105 kg of live weight ($a = 0.21 \pm 0.05^{***}$) and from 105 to 160 kg ($a = 0.41 \pm 0.07^{***}$), but no statistical evidence for this effect on appetite was detected in the initial growth period (35 to 65 kg). The positive effect of the T allele on appetite was correlated with positive effects on average daily growth, backfat thickness, intramuscular fat content, meat tenderness and percentages of saturated fatty acids in intramuscular and subcutaneous fat. Inversely, the T allele significantly decreased the weights and percentages of premium cuts (loin and trimmed shoulders and hams) adjusted for a common carcass weight. A genetic test based on this polymorphism may be useful to reduce the heterogeneity among meat and dry cured products from crossbred Duroc x Iberian pigs.

Keywords: pig, food intake, fatness, leptin receptor

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE PARTOS DE OVEJAS PORTADORAS DEL ALELO Fec X^R DEL GEN BMP 15

Laviña, A. ¹, Macías, A. ¹, Martín, E. ¹, Arellano, P. ¹, Murillo, S. ¹, Ponz, R. ¹, Monteagudo, L. V. ², Tejedor, M.T. ², Sierra, I. ³ y Vijil, E. ⁴

¹Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de la Raza "Rasa Aragonesa". (ANGRA). Cabañera Real s/n. 50800 ZUERA (ZARAGOZA). Email: angra@rasaaragonesa.com

²Departamento de Anatomía, Embriología y Genética. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. 50013 ZARAGOZA. Email: monteagu@unizar.es, ttejedor@unizar.es

³Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. 50013 ZARAGOZA. Email: isierra@unizar.es

⁴Area Técnica de Producción, Selección y Reproducción. (ATPSYRA). Avda. Movera 580. 50194 ZARAGOZA.

INTRODUCCIÓN

A finales de 2006 y durante la primera parte de 2007 se secuenciaron los genes BMP15 y GDF9 en un grupo selecto de ovejas que habían demostrado elevada prolificidad de acuerdo a los registros de la base de datos de ANGRA (Monteagudo et al., 2009). Ambos genes candidatos ya habían demostrado su interés en razas extranjeras. Dadas las limitaciones económicas del trabajo, fue necesario concretar el estudio a una serie pequeña de animales, con objeto de obtener resultados significativos en un periodo de tiempo relativamente breve. Los animales se escogieron por su elevada prolificidad, por la repetibilidad en los registros, por la alta prolificidad entre sus hijas y además por la evidencia de clara segregación en el carácter entre su descendencia, compatible con el efecto de un posible gen mayor. Siguiendo estos criterios, se eligieron en la base de datos de ANGRA un total de 12 ovejas de alta prolificidad y cinco moruecos, además de sementales donantes de semen del Esquema de Selección de todo Aragón. Uno de estos ejemplares era la oveja con la máxima prolificidad en la historia del programa de mejora (3,67 corderos/parto a lo largo de tres partos), junto a cuatro de sus hijas, que mostraban una clara segregación del carácter prolificidad: mientras tres de ellas mostraban una elevada prolificidad, la cuarta había alcanzado registros cercanos a la media de la raza.

La recogida de muestras ocupó 7 semanas entre noviembre de 2006 y enero de 2007. En ese tiempo se pusieron a punto los protocolos de análisis de ADN publicados previamente en la bibliografía (Galloway et al., 2000) y se diseñaron otros para simplificar los procesos de secuenciación de DNA en los dos genes objeto del estudio.

A mediados de febrero del 2007 habíamos identificado la presencia de una delección en el gen BMP15 en la oveja que ostentaba el record de prolificidad en la referida base de datos y en tres de sus hijas (Ganadería 1). Al tratarse de una ganadería "joven" en el Control de Producciones no disponíamos de grandes genealogías y se decidió analizar todos los machos y las ovejas de la ganadería, hasta localizar un total de ocho ovejas heterocigotas para la mutación FecX^R.

Paralelamente a este trabajo concreto, se seguía chequeando el Libro Genealógico con los criterios anteriormente expuestos. Esto nos ha permitido a finales de 2008 y principio de 2009 localizar el gen en veintiuna ovejas, cuatro corderas y tres sementales de otras dos ganaderías (Ganaderías 2 y 3). La existencia del gen en dichos machos ha hecho imprescindible el análisis completo de una de ellas, cuyos resultados están pendientes de completarse en el momento de remitir este resumen (febrero de 2009).

Un análisis de la distribución de partos de estas ovejas evidencia un elevado número de partos triples y superiores. El objetivo de este trabajo es evaluar las repercusiones que dicha distribución puede tener en los rebaños.

MATERIAL Y METODOS

Se han estudiado tres ganaderías sin relaciones genéticas conocidas, muy alejadas geográficamente unas de otras, cada una de ellas con características propias en cuanto a manejo reproductivo y sanitario, sistema de alimentación, selección de la reposición, etc..

La información utilizada acerca de los partos procede del Control de Producciones de dichas ganaderías del Libro Genealógico de la Rasa Aragonesa gestionado por ANGRA. Para el estudio estadístico se ha utilizado el paquete SPSS 14.0 . Las comparaciones de porcentajes se han realizado mediante el test de Chi cuadrado de Pearson y el estadístico exacto de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que los partos sencillos o dobles son más deseables para el ganadero que los partos triples o de más corderos, se han agrupado los partos en las dos categorías que muestra la tabla siguiente. Asimismo, en cada ganadería se han considerado dos grupos de ovejas según sean portadoras heterocigotas de la mutación $FecX^R$ (mutantes) o no (salvajes).

Tabla 1. Distribución de partos de las ganaderías estudiadas.

Explotación			Tipo de parto		Total
			Parto sencillo o doble	Parto triple o más	
1	Salvajes	Recuento	4614	73	4687
		(%)	98,4%	1,6%	100,0%
	Mutantes	Recuento	14	9	23
		(%)	60,9%	39,1%	100,0%
2	Salvajes	Recuento	7389	178	7567
		(%)	97,6%	2,4%	100,0%
	Mutantes	Recuento	33	5	38
		(%)	86,8%	13,2%	100,0%
3	Salvajes	Recuento	23847	548	24395
		(%)	97,8%	2,2%	100,0%
	Mutantes	Recuento	23	7	30
		(%)	76,7%	23,3%	100,0%

En todas las ganaderías se han detectado diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) en cuanto a la distribución de partos entre mutantes y salvajes, con una mayor frecuencia de partos triples o más en el caso de las mutantes. Así, los porcentajes de partos triples o más, que muestran unos valores de 1,6%; 2,4 %y 2,2% en salvajes, se elevan en mutantes a 39,1%; 13,2% y 23,3%, respectivamente.

En cuanto a la distribución de partos en mutantes, los porcentajes de partos triples o más son muy variables entre las tres explotaciones. Especialmente reseñable es el caso de la ganadería 1 en la que estos partos suponen el 39,1% de los partos de las ovejas mutantes. Esta variación podría deberse a factores como el diferente nivel de mejora de prolificidad alcanzado en cada ganadería, posible manejo reproductivo inapropiado por desconocimiento de la existencia de la mutación $FecX^R$, etc. Sin embargo, estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ($P=0,066$), tal vez por el bajo número de datos de mutantes disponibles hasta el momento en la explotación 1.

En conclusión, el análisis de la distribución de los partos de las ovejas mutantes pone de manifiesto la existencia de un porcentaje no desdeñable de partos triples o superiores. Esta circunstancia debe ser conocida por los gestores de las explotaciones, de forma que se mantengan bajo estricto control técnico todos los actos que puedan afectar a la reproducción de dichos animales (tratamientos hormonales, etc). Dicho control debe extenderse al total de la explotación siempre que se conozca la existencia de la mutación en la misma y no se haya realizado una identificación fiable mediante análisis de ADN de los animales mutantes. De esta forma, se podrán minimizar los posibles efectos no deseados, empezando, como es lógico, por evitar la introducción en los lotes de reposición de corderas homocigotas $FecX^R / FecX^R$, que serán estériles a lo largo de toda su vida.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• Monteagudo, L. V., Ponz, R., Tejedor, M. T., Laviña, A. & Sierra, I. 2009. *Ani. Repro. Sci.* 110: 139-146. • Monteagudo, L. V., Ponz, R., Tejedor, M. T., Laviña, A. & Sierra, I. 2008. *pR* 9, Num.2: 24-31. • Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P.E., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luiro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H. & Ritvos, O. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25, 279-283.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado principalmente con fondos propios. En este sentido agradecemos al Gobierno de Aragón y al Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino su cobertura económica y administrativa. Una parte del trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con la Universidad de Zaragoza, a la que también queremos expresar nuestro agradecimiento. Especialmente deseamos manifestar nuestra gratitud a los ganaderos de ANGRA y en especial a los ganaderos propietarios de las tres ganaderías por su entusiasta colaboración.

SINGLE AND MULTIPLE BIRTHS DISTRIBUTION IN EWES HETEROZYGOUS FOR THE ALLELE $FecX^R$ OF THE LOCUS $BMP15$

ABSTRACT: The distribution of single and multiple births obtained from ewes heterozygous for the mutation $FecX^R$ in three different flocks of Rasa Aragonesa sheep breed is studied. In all cases, the existence of the mutation was ignored by the managers. The proportion of births producing three or more lambs was significantly increased in all cases. While these births were 1.6%, 2.4 % and 2.2% among the wild-type ewes in each flock, the proportion increased to 39.1%, 13.2% and 23.3% respectively among the females bearing $FecX^R$. Such a wide range suggest the need for a strict technical control of the management factors affecting prolificacy in the different flocks (hormone treatments, etc) whenever the existence of the $FecX^R$ mutation is detected or suspected. In this way, the possible undesired effects could be minimized. The most important among them is sterility in $FecX^R / FecX^R$ homozygous ewes.

Keywords: *prolificacy distribution, $FecX^R$, sheep, $BMP15$*

IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN GANADO CAPRINO

Zidi, A.¹, Jordana, J.¹, Carrizosa, J.², Gallardo, D.¹, Urrutia, B.² y Amills, M.¹

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra; ²Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).

Estación Sericícola. La Alberca, Murcia.

E-mail de contacto. Ali.Zidi@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La grasa de la leche está compuesta fundamentalmente de triglicéridos y constituye un aporte fundamental de energía a la vez que posee una gran influencia sobre las propiedades físicas y tecnológicas de la leche y sus derivados (Arnould y Soyeurt, 2009). El contenido y composición de la grasa de la leche suele ser bastante variable puesto que los factores de tipo genético y ambiental (sobre todo nutricionales) tienen un gran efecto sobre el mismo (Bauman et al., 2006; Soyeurt et al., 2006). Un porcentaje muy significativo de la grasa de la leche está constituido por ácidos grasos saturados (65-70%), característica que, desde un punto de vista nutricional se considera desfavorable dado que está asociada a un mayor riesgo de sufrir aterosclerosis, obesidad y enfermedades coronarias (Arnould y Soyeurt, 2009). Por otra parte, la composición de la grasa de la leche tiene efectos sobre las propiedades organolépticas del queso (en cuanto a aroma y sabor) y de la mantequilla (Arnould y Soyeurt, 2009). Estas consideraciones ponen de manifiesto el interés de seleccionar los caracteres vinculados al contenido y la composición de la grasa con la finalidad de mejorar las características nutricionales y tecnológicas de la leche. El hecho de que, por lo general, dichos caracteres tengan heredabilidades moderadas (entre 0.2-0.4) es un factor favorable en cuanto a implementar esquemas de selección. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, la existencia de correlaciones desfavorables entre estos caracteres p.e. el aumento de ácidos grasos saturados conlleva una disminución del contenido graso de la leche (Arnould y Soyeurt 2009).

En bovino, se ha identificado diversos polimorfismos con efectos significativos sobre el contenido y la composición de la grasa de la leche. Por ejemplo, se ha observado que una sustitución no sinónima (K232A) en el gen *DGAT1* está asociada a variaciones en el porcentaje de grasa y en la proporción de ácidos grasos insaturados vs saturados (Arnould y Soyeurt, 2009). Dicho conocimiento tiene una aplicación práctica en cuanto a la implementación de esquemas de selección asistida por marcadores. En ganado caprino, por el contrario, el número de polimorfismos caracterizados hasta la fecha es relativamente bajo y ninguno parece tener un efecto causal. En el presente trabajo, se ha procedido a caracterizar la variabilidad genética de cinco loci relacionados con el metabolismo lipídico en una población de cabras de la raza Murciano-Granadina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los genes analizados en el presente estudio codifican la *estearoil-CoA desaturasa (SCD)*, el *enzima málico 1 (ME1)*, la *lipasa sensible a hormonas (LIPE)*, el *antígeno CD36 o translocasa de ácidos grasos (CD36)* y el *receptor de la prolactina (PRLR)*. Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado y de glándula mamaria utilizando el kit RiboPure Kit (Ambion). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit Thermoscript RT-PCR System Kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación para cada uno de los genes no se detallan en esta sección pero pueden solicitarse al autor responsable del trabajo (Ali.Zidi@uab.cat). Los productos amplificados fueron secuenciados mediante el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730 DNA Analyser (Applied

Biosystems). Con la finalidad de identificar posibles posiciones polimórficas, las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa Multalin (Corpet, 1988).

Una población de 400 cabras de la raza Murciano-Granadina fueron genotipadas para los distintos polimorfismos nucleotídicos (SNP) caracterizados en el presente trabajo, ya fuera mediante la tecnología Sequenom hME (Centro Nacional de Genotipado, CEGEN) o bien con el kit SnaPshot ddNTP Primer Extension kit (Applied Biosystems)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha procedido a secuenciar parcialmente los genes *SCD*, *ME1*, *LIPE*, *CD36* y *PRLR* en 8 individuos de las razas Murciana Granadina y Malagueña. Las secuencias obtenidas presentaron una elevada similitud nucleotídica (92-96%) con los genes ortólogos humanos. La comparación de secuencias en distintos individuos mediante el programa Multalin permitió identificar 20 posiciones polimórficas que se detallan en la Tabla 1

Tabla 1. Polimorfismo de diversos genes del metabolismo lipídico en ganado caprino

Gen	Sustitución	Frecuencia,%	Posición	Región	Naturaleza
<i>SCD</i>	C-T	35 (alelo C)	928	codificante	sinónimo
	Del TGT ¹	71.15 (Del TGT)	3180	3'UTR	-
	A-G	71 (Alelo G)	4780	3'UTR	-
<i>ME1</i>	C-T	71 (Alelo C)	600	codificante	sinónimo
	A-G	90 (Alelo G)	784	codificante	sinónimo
	C-T	No genotipado	1044	codificante	sinónimo
	A-G	90 (Alelo G)	1317	codificante	sinónimo
<i>LIPE</i>	C-T-A	81 (Alelo C)	1507	codificante	sinónimo
	C-T	78 (Alelo C)	1738	codificante	sinónimo
	G-T	97 (Alelo G)	2342	codificante	cambio A-S
<i>CD36-21</i> ²	A-G	58 (Alelo A)	589	codificante	cambio N-D
	C-T	75 (Alelo C)	1755	3'UTR	-
	T-C	91 (Alelo T)	2037	3'UTR	-
	T-A	90 (Alelo T)	2043	3'UTR	-
<i>CD36-4</i> ²	C-T	No genotipado	473	codificante	sinónimo
	C-A	52 (Alelo C)	571	codificante	sinónimo
<i>PRLR</i>	C-T	94 (Alelo C)	263	codificante	sinónimo
	A-G	84 (Alelo G)	1256	codificante	sinónimo
	A-G	84 (Alelo G)	1326	codificante	cambio R-G
	C-T	94 (Alelo C)	1480	codificante	Cambio T-I

¹ Previamente descrita por Bernard et al. (2001) en la raza francesa Alpina.

² El gen *CD36* está duplicado tanto en caprino como en bovino, especie en la cual se ha determinado la existencia de dos copias localizadas en los cromosomas 4 y 21.

Cabe destacar, que al amplificar la región codificante del gen *CD36* se observó la existencia de dos secuencias distintas con una similitud nucleotídica de 88%. La búsqueda de genes ortólogos en bovino demostró la existencia de dos loci distintos: uno situado en el cromosoma 4 bovino (cuyo ortólogo humano se halla en el cromosoma 7q11.2-qter, Clavo et al., 1995) y otro cuya localización coincide con el cromosoma 21 bovino (Berguland et al., 1996, Karall-Albrecht et al., 2000) y carece de ortólogo en humano. Todo ello indica que el gen *CD36* ha sufrido una duplicación cuya existencia precede a la radiación de bovinos y caprinos (20 MYR). Por otra parte, también cabe destacar la detección de *splicing* alternativo en el gen *PRLR*, con dos isoformas larga (codifica una proteína de 466 aminoácidos) y corta

(272 aminoácidos). La existencia de este fenómeno de *splicing* alternativo del gen *PRLR* ya había sido descrita por Bignon et al. (1997) en ovino y otros rumiantes. En la isoforma corta, se observa la existencia de una inserción de 39 pb contigua, en posición 5', al exón 10 y portadora de dos codones *stop* sucesivos, por lo que da lugar a una proteína de menor tamaño. Actualmente, se está procediendo a realizar análisis de asociación entre los distintos polimorfismos identificados y caracteres relacionados con el contenido y composición de la grasa en una población de cabras de raza Murciano-Granadina

Agradecimientos: Este trabajo de investigación se ha financiado en el contexto del proyecto CICYT AGL2007-66161-C02-02 concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Alí Zidi ha sido beneficiario de una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación (AECI) y, posteriormente, de otra del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arnould & Soyert, 2009. J. Appl. Genet. 50: 29-39.
- Bauman et al., 2006. J. Dairy Sci. 89: 1235-1243.
- Berguland et al., 1996. Biochim. Biophys. Acta 1309: 63-68.
- Bernard et al., 2001. Gene 281: 53-61.
- Bignon et al., 1997. J. Mol. Endocrinol. 19: 109-120.
- Clavo et al., 1995. Genomics 25: 100-106.
- Karall-Albrecht et al., 2000. Mamm. Genome 11: 320-325.
- Soyeyrt et al., 2006. J. Dairy Sci. 89: 4858-4865.

POLYMORPHISM OF FIVE LIPID METABOLISM GENES IN GOATS

ABSTRACT: Milk fat is an important factor influencing the nutritional and technological quality of dairy animal products. The existence of moderate heritabilities (from 0.2 to 0.4) for milk fat percentage and fatty acids profile evidences the segregation of allelic variants with important additive effects on lipid metabolism traits. In this work, we have characterized the polymorphism of five functional candidate genes, with different roles on lipid synthesis, transport and degradation, in a Murciano-Granadina goat population. Genes under study were *stearoyl-CoA desaturase (SCD)*, *malic enzyme 1 (ME1)*, *hormone-sensitive lipase (LIPE)*, *antigen CD36 (CD36)* and *prolactin receptor (PRLR)*. Partial sequencing of these loci revealed the existence of 20 polymorphisms that have been genotyped in the Murciano-Granadina goat population in order to perform an association analysis with milk fat percentage and composition traits. Moreover, our data evidence that the *CD36* gene is duplicated in goats as well as the existence of alternative splicing in the caprine *PRLR* gene

Keywords: Goat, milk fat, single nucleotide polymorphism, fatty acid profile.

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN DE LA ACETIL-CoA CARBOXILASA α (ACACA) EN LAS RAZAS OVINAS CHURRA Y OJALADA

García-Fernández, M., Gutiérrez-Gil, B., García-Gámez, E. y Arranz, J.J.
Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24071 León. mgarf@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La acetil-CoA carboxilasa α (ACACA) posee un papel fundamental en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga catalizando la biotin-carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA. El malonil-CoA es el sustrato sobre el que actúa la Sintasa de ácidos grasos (FAS) que a través de siete reacciones de condensación cataliza la síntesis de ácido palmítico (Smith et al., 2003) y otros ácidos grasos de cadena larga (Leonard et al., 2000). A pesar de que esta enzima se expresa de forma general en el organismo, los mayores niveles de expresión se localizan en tejidos lipogénicos como el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria durante el periodo de lactación. En este periodo se facilita la llegada de precursores para la síntesis de la grasa de la leche a la glándula mamaria mediante la represión de la ACACA en tejido adiposo y la inducción del mismo gen en la glándula mamaria (Barber et al., 1997).

El gen ACACA ovino se localiza en el cromosoma 11 (OAR11), posee 54 exones y codifica una proteína de 2346 aminoácidos (Barber y Travers, 1995). El importante papel de esta enzima en la síntesis de los ácidos grasos tanto a nivel de tejido muscular como mamario le sitúa como un importante candidato funcional para explicar parte de la variabilidad fenotípica observada en la composición tanto cualitativa como cuantitativa de la grasa de la carne o de la leche en el ganado ovino.

En función de lo expuesto, en el presente trabajo pretendemos analizar la variabilidad genética del gen ACACA en el ganado ovino. Estos resultados podrán ser empleados en el futuro para búsqueda de asociaciones entre formas alélicas del gen y la composición grasa de los productos derivados del ganado ovino (carne y/o leche).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: Para la búsqueda de variabilidad se utilizaron 24 hembras no relacionadas de raza Churra. Los SNPs detectados se genotiparon en 15 animales de las razas Churra y Ojalada, ambas con diferente aptitud productiva.

Obtención de cDNA: Para el estudio de la región codificante del gen ACACA se realizó la extracción del RNA total de glándula mamaria de 24 ovejas no relacionadas de raza Churra para su posterior retrotranscripción a cDNA (SuperScript™ III First-Strand Síntesis System for RT-PCR, Invitrogen™). El genotipado de los SNPs en las 2 razas ovinas estudiadas se realizó a partir de DNA genómico extraído de sangre completa mediante el protocolo estándar descrito en García-Fernández et al. (2009).

Secuenciación y detección de polimorfismos: Utilizando como referencia la secuencia del RNAm del gen ACACA ovino (GenBank Accession No NM001009256.1) se diseñaron 8 parejas de primers para amplificar una región de aproximadamente 4,3 Kb del gen ACACA. Los fragmentos resultantes fueron purificados mediante digestión con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio). La reacción de secuenciación cíclica se llevó a cabo utilizando los mismos primers que se emplearon para la amplificación y el kit de secuenciación "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones fueron procesadas en un 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) y las secuencias obtenidas se analizaron con el software SeqScape v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis genotípico: Los SNPs identificados se genotiparon mediante secuenciación directa del DNA de 15 animales de cada una de las 2 razas ovinas estudiadas utilizando los mismos primers que para la detección de los polimorfismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Figura 1, se ha secuenciado la mayoría de la región codificante del gen ACACA ovino (exones 1 a 35) y se han localizado 11 SNPs sinónimos. Las posiciones de los mismos se muestran en la Figura 1.

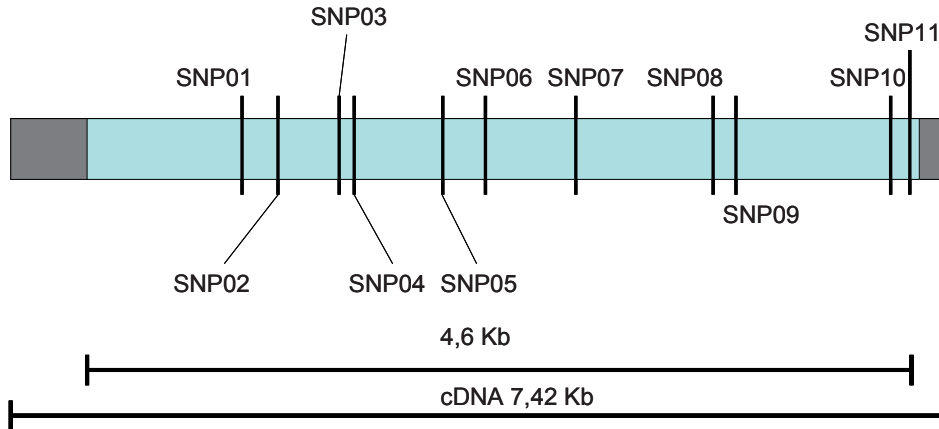


Figura 1. Representación esquemática del cDNA del gen ACACA (rectángulo gris) del fragmento amplificado (rectángulo azul) y de la posición de los 11 SNPs localizados.

En la Tabla 1 se muestran las frecuencias alélicas de los 11 polimorfismos detectados en las dos razas analizadas. La variabilidad media del gen ha sido elevada ya que se han detectado 11 SNPs en un total de 4.600 bp analizados con una media aproximada de 1 SNP cada 420 bp analizados en los 24 animales secuenciados. La variación observada es mayor que la media detectada en otros genes candidatos secuenciados en la misma muestra de animales (datos en preparación). Como se puede observar en la Tabla 1 la información de los SNPs es heterogénea. Así se han detectado 5 polimorfismos con una frecuencia del alelo raro (*Minor allele frequency*, MAF) superior a 0.2 en ambas poblaciones (SNP01, SNP04, SNP06, SNP07 y SNP11), siendo el más informativo el SNP06 donde el valor medio de MAF ha sido de 35.5%.

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los SNPs detectados en las razas Churra y Ojalada. La frecuencia mostrada se refiere al alelo que presente una menor frecuencia en la raza Churra

	Churra	Ojalada	Frec. media
SNP01	0,42	0,87	0,275
SNP02	0,05	0,05	0,05
SNP03	0,16	0,21	0,185
SNP04	0,19	0,25	0,22
SNP05	0,08	0,11	0,095
SNP06	0,25	0,46	0,355
SNP07	0,21	0,38	0,295
SNP08	0,04	0	0,02
SNP09	0,04	0	0,02
SNP10	0,1	0,04	0,07
SNP11	0,3	0,13	0,215
Frecuencia media por raza	0,17	0,23	

Los otros SNPs han sido menos informativos destacando los SNP08 y SNP09 que únicamente han mostrado variabilidad en el caso de la población de raza Churra. Este efecto puede ser debido al diferente tamaño muestral analizado en las dos poblaciones (39 animales en Churra frente a 15 de Ojalada). Por lo que respecta a las diferencias alélicas hay que destacar el SNP01 dónde el mismo alelo ha presentado una frecuencia de 0.42 en Churra y 0.87 en Ojalada, razas con diferente especialización. Es difícil dar una interpretación funcional a los resultados dado que estamos en el estudio de detección de variabilidad y se han estudiado pocos animales. El uso de estos SNPs como marcadores en futuros estudios de asociación nos podrá dar una idea de la importancia funcional de los mismos en relación a la composición de la grasa de los productos ovinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T. & Vernon, R. G. 1997. *Biochem. Biophys. Acta.* 1347:101-126.
- Kong, I.S., Lopez-Casillas, F. & Kim, K. H. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 13695-13701.
- Salles, J., Sargueil, F., Knoll-Gellida, A., Witters, L.A., Casagne, C. & Garbay, B. 2003. *Biochim. Biophys. Acta;* 1631: 229-238.
- Barber, M. C., Pooley, L. & Travers, M. T. 2001. *J. Mol. Endocrinol.* 27: 349-356.
- Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K. 2003. *Prog Lipid Res.* 42 289-317.
- Leonard, A. E., Pereira, S. L., Sprecher, H. & Huang, Y. S. 2004. *Prog Lipid Res.* 43: 36-54.
- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T. & Vernon, R. G. 1997. *Biochem. Biophys. Acta.* 1347: 101-126.
- Barber, M. C. & Travers, M. T. 1995. *Gene.* 154: 271-275.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el proyecto AGL2005-04321 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y del Proyecto GR43 de la Junta de Castilla y León para grupos de excelencia. Elsa García Gámez disfruta de un contrato para Investigadores jóvenes de la Junta de Castilla y León cofinanciado por el Fondo Social Europeo. Marta García Fernández es becaria FPI (MICINN). Beatriz Gutiérrez Gil disfruta de un Contrato del Programa Juan de la Cierva (MICINN).

GENETIC VARIABILITY IN THE ACETYL-CoA CARBOXYLASE GENE IN CHURRA AND OJALADA SHEEP BREEDS.

ABSTRACT: Acetyl-CoA carboxylase (ACACA) is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of long-chain fatty acids. We have sequenced about 4.6 kb of the ovine ACACA cDNA, which included partial exon 1 to exon 35, in order to detect SNP. A total of 11 synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the analysed sequence. After that the frequency of this 11 SNPs were verified in 2 Spanish sheep breeds with different production goal (Churra and Ojalada). The genetic variability of the gene is higher than other candidates analysed in sheep with a SNP every 420 bp. Five of the polymorphisms displays a high informativity in both populations and one of them is breed-specific (SNP09 in Churra) The characterization of the allelic variants reported herein laid the basis for further association analyses needed to evaluate the potential use of these SNPs as genetic markers for fat content and fatty acid composition of sheep products.

Keywords: *Acetyl-CoA carboxylase, sheep, single nucleotide polymorphism.*

CONFIRMACIÓN DE UN QTL CON EFECTO SOBRE CARACTERES DE PRODUCCION DE LECHE EN LA RAZA OVINA CHURRA

García-Gámez, E., Gutiérrez-Gil, B., García Fernández, M., Sánchez, J.P., de la Fuente, L.F. San Primitivo, F. y Arranz J.J.

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. E-mail: egarg@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la producción de leche de ganado ovino se concentra en los países mediterráneos y va unida a la explotación de razas locales para la producción de queso de alta calidad. La mejora y el mantenimiento de estos sistemas de explotación son importantes, además de por una significación histórica y cultural, para el mantenimiento de estas poblaciones en áreas más desfavorecidas y la conservación de los ecosistemas. El principal factor que contribuye a este mantenimiento es la explotación de esas razas locales rentables. Para ello y desde hace años se han establecido programas de selección con objeto de mejorar sus producciones. Además, como complemento de los anteriores, se han realizado estudio con herramientas moleculares que intentan detectar genes con influencia sobre diferentes caracteres productivos.

Los primeras investigaciones de QTL en la raza Churra fueron hechos por nuestro grupo de investigación analizando cromosomas candidatos (Díez-Tascón et al., 2001).

Posteriormente se llevó a cabo un barrido genómico en busca de regiones que portaran QTL para diferentes caracteres: morfología mamaria y recuento de células somáticas como parámetro relacionado con la resistencia a la mastitis (Gutiérrez-Gil et al., 2007; Gutiérrez-Gil et al., 2008) y con caracteres de producción de leche (Gutiérrez-Gil et al., 2009). Con objeto de detectar la verdadera naturaleza de estos QTL, es necesaria la confirmación de estos efectos. Una de las formas de confirmar estos QTL es mediante el análisis de una muestra independiente de hijas de las familias que han mostrado evidencia de segregación, así como el análisis de nuevas familias. En el presente artículo presentamos el análisis de uno de los QTL detectado y la confirmación en una muestra independiente de familias analizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se han utilizado dos conjuntos de datos, por un lado los producidos en el *genome scan* por Gutiérrez-Gil et al. (2007) y por otro las nuevas familias muestreadas para la confirmación. Los nuevos animales son un total de 841 medio hermanas distribuidas en 15 familias, pertenecientes a 16 rebaños del núcleo de selección de ANCHE. El tamaño medio de las familias es de 83 ovejas, variando entre 27 y 260 animales.

Para el estudio del cromosoma 20 se eligieron marcadores microsatélites utilizados en la construcción de un mapa de ligamiento en la población de raza Churra (Gutiérrez-Gil et al., 2008): BM1248, BM1905, BP34, DYA, INRA132, MCMA23 y OLADRB. Tras la obtención del ADN, se amplificaron los marcadores mediante PCR y se obtuvieron las variantes alélicas a partir de la electroforesis en un secuenciador *ABI3130 Genetic Analyzer*. La identificación alélica se llevó a cabo utilizando el software GeneMapper 4.0.

La elaboración del mapa de ligamiento se realizó mediante programa CRIMAP (Green et al., 1990) empleando las rutinas *build* y *chrompic* para la construcción del mapa y el control de múltiples recombinantes, respectivamente. Los caracteres utilizados en la detección de QTL han sido: cantidad de leche (MY), porcentaje de proteína (PP) y porcentaje de grasa (FP). Los caracteres empleados ha sido las “*yield deviations*” obtenidas al corregir los valores brutos para los factores fijos que mostraron significación. Posteriormente, el análisis para la confirmación del QTL se llevó a cabo con el programa *GridQTL* (Seaton et al., 2006) que utiliza un método de regresión con múltiples marcadores desarrollado por Knott et al. (1996). Los valores con significación *chromosome-wise* fueron determinados mediante 10.000 permutaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el mapa obtenido tras el análisis de ligamiento en cada cM del cromosoma 20 ovino, en concordancia con el mapa previamente publicado (Maddox et al., 2001; Gutiérrez-Gil et al., 2008). Asimismo, se representan los valores del parámetro contenido de información (CI) a lo largo del mapa. La longitud del mapa fue de 89 cM (Kosambi). El contenido de información promedio fue del 70%, con un valor máximo de 88,52% en la posición del marcador *DYA*, y un mínimo de 49,49% en el intervalo [BM1905-MCMA23].

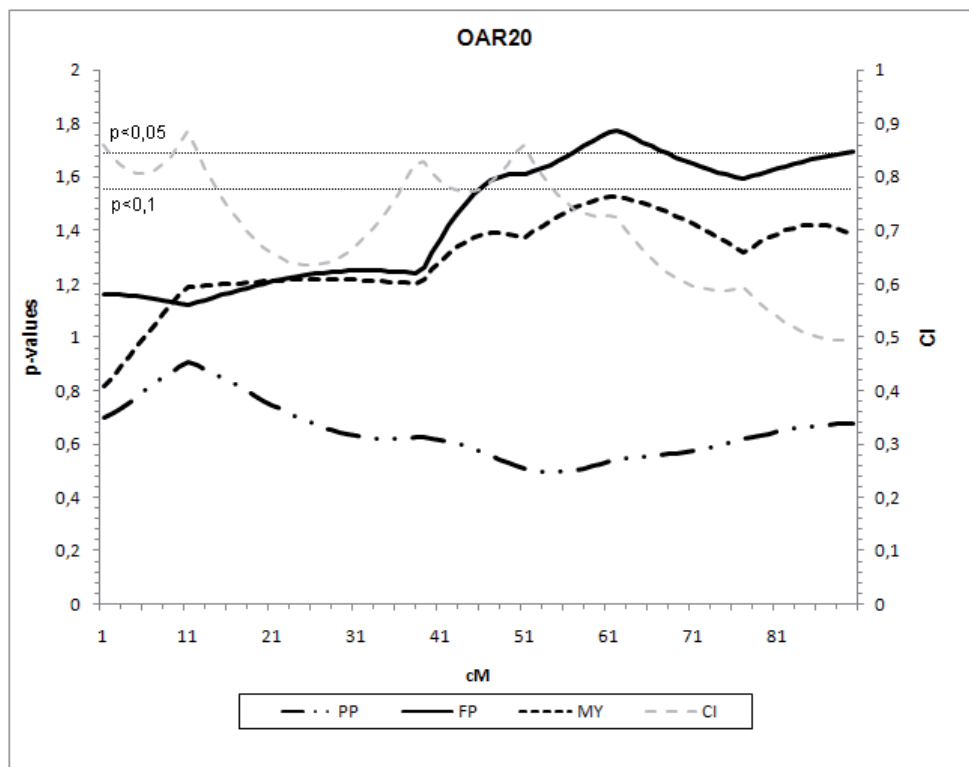


Figura 1. Distribución de los valores de contenido de información (IC) y de significación del test estadístico expresado como $\log_{10}(1/P)$ para los caracteres de producción de leche (MY) Porcentaje de Proteína (PP) y porcentaje de grasa (FP) a lo largo del cromosoma OAR20 (análisis across-families)

Además, se muestran en esta figura los perfiles para el test estadístico obtenidos en el análisis global de la población, para cada uno de los caracteres considerados en este trabajo. Se indican en ella los niveles de significación 5% y 10% *chromosome-wise* para el carácter porcentaje de grasa.

De acuerdo con este análisis aparece un QTL en este cromosoma para el carácter porcentaje de grasa, con valor máximo del estadístico en la posición 61 cM, con *p-value* asociado de 0,0309 (*chromosome-wise*). Tras el análisis intrafamiliar (*within-family*), se obtuvieron un total de seis familias segregantes. De este modo, las nuevas familias añadidas confirmaron los resultados obtenidos a cerca de la presencia de un QTL para el parámetro porcentaje de grasa (FP).

En un estudio previo, Barillet et al. (2006) identificaron, en una población Sarda X Lacaune, este mismo QTL en la región del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC), coincidente con la posición de nuestro QTL en el análisis "*across-family*". Además, un posible gen

candidato, tanto posicional como funcional, como es la prolactina (PRL) se encuentra entre los marcadores OLADRB y BP34, así como otras proteínas relacionadas con la prolactina (PRLP1, PRLP3, PRLP4).

El siguiente paso sería un estudio de mapeo fino para comprender la arquitectura genética de esa región, con el fin de poner de manifiesto la mutación causante del efecto detectado. De todas formas, la localización cercana al efecto detectado del gen de la prolactina, señala a éste como un candidato idóneo, y posible responsable del efecto detectado. La detección de SNPs en este gen y la posible asociación mediante técnicas de desequilibrio de ligamiento, pueden ayudar a clarificar de forma más precisa la naturaleza de esta asociación y el papel de dicho gen en la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Díez-Tascón, C., Bayón, Y., Arranz, J. J., De La Fuente, L. F., & San Primitivo F. 2001. *J Dairy Res* 68, 389-397.
- Green, P., Falls, K., & Crooks, S., 1990. Doc. for CRIMAP.
- Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J. J., El-Zarei, M.F., Álvarez, L., Pedrosa, S., San Primitivo, F. & Bayón Y. 2008. *J Anim Breed Genet* 125, 201-204.
- Gutiérrez-Gil, B., El-Zarei, M.F., Alvarez, L., Bayón, Y., de la Fuente, L.F., San Primitivo, F. & Arranz, J.J., 2008. *J Dairy Sci* 91(9):3672-81.
- Gutiérrez-Gil, B., El-Zarei, M.F., Alvarez, L., Bayón, Y., de la Fuente, L.F., San Primitivo, F. & Arranz J.J., 2009. *Anim Genet*. In press.
- Gutiérrez-Gil, B., El-Zarei, M. F., Bayón, Y., de la Fuente, L. F., San Primitivo, F. & Arranz J. J. 2007. *J Dairy Sci* 90, 422-426.
- Knott, S. A., J. M. Essen, & C. S. Haley, 1996. *Theoret Appl Genet*. 93: 71-80.
- Seaton, G., Hernandez, J., Grunchev, J.A., White, I., Allen, J., De Koning, D.J., Wei, W., Berry, D., Haley, C. & Knott, S. (2006) *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, August 13-18, 2006. Belo Horizonte, Brazil.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el proyecto AGL2005-04321 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y del Proyecto GR43 de la Junta de Castilla y León para grupos de excelencia. Elsa García Gámez disfruta de un contrato para Investigadores jóvenes de la Junta de Castilla y León cofinanciado por el Fondo Social Europeo. Marta García Fernández es becaria FPI (MICINN). Beatriz Gutiérrez Gil disfruta de un Contrato del Programa Juan de la Cierva (MICINN).

CONFIRMATION OF QTL UNDERLYING DAIRY PRODUCTION TRAITS IN SPANISH CHURRA SHEEP

ABSTRACT: After a preliminary genome scan carried out in Churra sheep to detect QTL influencing milk production traits, additional families are now been analyzed to confirm some of the identified effects. We present here the confirmation of the QTL located in chromosome 20 for fat percentage. This meta-analysis was performed adding 15 new families to the ones previously analyzed. The total number of animals was 2.054, distributed in 25 families, one of them common in both studies. Phenotypic measurements studied included milk yield, protein percentage and fat percentage (FP). All the population was genotyped for seven microsatellite markers evenly distributed across the studied chromosome. Response variables used in the QTL analysis were yield deviations, estimated from the phenotypic data corrected for fixed environmental effects. For the QTL analysis, a multimarker regression method was implemented through the GridQTL software. Chromosome-wise critical values were calculated through 10.000 permutations. The average information content across the chromosome was 0.70. An across-family association analysis confirmed a region on this chromosome carrying the QTL for FP at the 5% chromosome-wise level (p -value = 0.0309). The within-family analysis revealed 6 families segregating for the QTL. This confirmation is the previous stage of a fine-mapping approach of this QTL.

Keywords: *sheep, milk, QTL, fat percentage.*

ESTIMACIÓN DE LA CORRELACION GENETICA ENTRE SEXOS EN LOS CARACTERES PRODUCTIVOS DE LA RAZA BOVINA PIRENAICA

Archanco, C.¹, Blanco, A.¹, Castillo, A.J.¹, Domingo, V.¹, Oliver, L.¹, Segarra, A.¹, Tena, B.¹, Altarriba, J, Moreno, C. y Varona, L.

Unidad de Genética Cuantitativa y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria. 50013.

Zaragoza.lvarona@unizar.es

¹ Todos los autores contribuyen en el mismo grado a la realización del trabajo.

INTRODUCCIÓN

Los modelos habituales de evaluación genética asumen que los caracteres expresados en machos y hembras están determinados por el mismo patrimonio genético. Pese a todo hay numerosas evidencias de heterogeneidad tanto en la media como en la varianza, que se han atribuido tanto a un efecto de escala, como al diferente grado de madurez alcanzado por cada sexo a una edad determinada.

Tradicionalmente los modelos de evaluación incluyen un efecto sistemático para corregir la influencia en la media y, en ocasiones, también se ha utilizado un modelo de varianza heterogéneas entre sexos para corregir diferencias en la variabilidad (Varona et al., 1997).

Estos dos planteamientos asumen que la regulación genética de los caracteres expresados en machos y hembras son equivalentes, y, bajo esta asunción, la correlación genética entre ambos en un modelo multicaracter debería ser uno. En este trabajo se pretende verificar esta hipótesis mediante la estimación de la correlación genética entre sexos para siete caracteres de crecimiento y producción en la Raza Bovina Pirenaica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se han utilizado datos de peso al nacimiento (PN), peso a los 120 días (P120) y peso a los 210 días (P210), proporcionados por CONASPI- Confederación Nacional de Asociaciones de Vacuno Pirenaico-, y Peso de la canal fría (PC), Conformación (CONF), Cobertura Grasa (CG) y Color (COL), procedentes del Sistema Nacional de Identificación y Movimiento de Ganado Bovino (SIMOGAN). El número de individuos registrados, la media y la desviación típica para cada carácter se presentan en la Tabla 1. Una descripción más amplia de estos caracteres puede encontrarse en Altarriba et al. (2009).

Se ha realizado un análisis bayesiano bicaracter mediante muestreo de Gibbs utilizando el programa TM (Legarra et al., 2008). El modelo de evaluación incluyó los efectos sistemáticos estación, explotación y año, además de matadero para PC, CONF, CG y Col y una covariada con la edad. En cada análisis se realizaron 225000 iteraciones y se descartaron las 25000 primeras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medias y desviaciones típicas posteriores de las heredabilidades y correlaciones genéticas se presentan en la Tabla 2. Los estimadores posteriores de la heredabilidad estuvieron en el rango de las estimaciones previas disponibles tanto en esta población (Altarriba et al., 2009), como en otras poblaciones de vacuno de carne (Rios-Utrera y Van Vleck, 2004). Los resultados son muy similares entre machos y hembras para los caracteres de crecimiento pero difieren en mayor medida para los caracteres registrados en matadero, mostrando una heredabilidad mayor en hembras.

Las medias posteriores de las correlaciones genéticas entre sexos fueron siempre positivas, aunque se observó cierta variabilidad en los resultados. Los estimadores de correlaciones genéticas de los caracteres de crecimiento a edades más tempranas fueron más cercanos a uno (0.92 para PN y P120), alejándose de la correlación total a medida que los individuos alcanzan edades más maduras (0.87 para P210 y 0.79 para PC). Este fenómeno se explica gracias a los diferentes grados de madurez a los 210 días y al sacrificio entre machos y

hembras, y, posiblemente a la expresión inicial de genes relacionados con los procesos hormonales diferenciados.

Los caracteres registrados en el matadero (CONF, CG y COL) mostraron correlaciones genéticas inferiores a los caracteres de crecimiento. Como en el caso anterior se trata de caracteres registrados a edad más avanzada y, además, incluyen la incertidumbre asociada a una valoración subjetiva por parte de un evaluador, que puede interpretar y definir criterios alternativos para machos y hembras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Altarriba, J., Yague, G., Moreno, C. & Varona, L. 2009. Exploring possibilities of the traceability data for genetic improvement in the Pirenaica Beef Cattle Breed. *Lives. Sci.* (Submitted).
- Legarra, A., Varona, L. & Lopez de Maturana, E.. 2008. Threshold Model. <http://cat.toulouse.inra.fr/~alegarra/>
- Rios-Utrera, A. & Van-Vleck, L. D. 2004. Heritability estimates for carcass traits of cattle: a review. *Genet. Mol. Res.* 3:380-394.
- Varona, L., Moreno, C., García-Cortés, L.A. & Altarriba, J. 1997. Model determination in a case of heterogeneity of variance using sampling techniques. *J. Anim. Breed. Genet.* 114:1-12.

Tabla 1. Número de individuos (N), media y desviación típica (DT) para PN, P120, P210, PC, CONF, CG y COL.

	PN	P120	P210	PC	CONF	CG	COL
N	52559	26188	15559	20011	15809	13740	3478
Media	41.66	165.3	264.8	297.7	3.67	2.16	2.26
DT	5.01	45.76	58.87	55.21	0.46	0.51	0.34

Tabla 2. Medias y desviaciones típicas posteriores (entre paréntesis) para las heredabilidades (h_m^2 y h_h^2) y correlaciones genéticas (r_a) de PN, P120, P210, PC, CONF, CG y COL.

	PN	P120	P210	PC	CONF	CG	COL
h_m^2	0.37 (0.01)	0.39 (0.02)	0.41 (0.03)	0.38 (0.03)	0.31 (0.04)	0.18 (0.03)	0.25 (0.05)
h_h^2	0.33 (0.01)	0.37 (0.02)	0.43 (0.03)	0.44 (0.05)	0.45 (0.06)	0.28 (0.05)	0.46 (0.12)
r_a	0.92 (0.02)	0.92 (0.03)	0.87 (0.05)	0.79 (0.07)	0.55 (0.10)	0.79 (0.07)	0.35 (0.17)

GENETIC CORRELATION BETWEEN SEXES IN PRODUCTIVE TRAITS OF THE PIRENAICA BEEF CATTLE BREED.

ABSTRACT: Models for genetic evaluation usually assumed that genes involved in the phenotypic expression of quantitative traits in males and females are the same. However, there are substantial evidences of heterogeneity at mean or variance level. The objective of this study is to estimate the genetic correlation between sexes in seven traits of the Pirenaica Beef Cattle breed. Traits included in the analysis were PN (Birth Weight), P120 (Weight at 120 days), P210 (Weight at 210 days), PC (Cold Carcass Weight), CONF (Conformation Score), CG (Fat Cover Score) and COL (Color score). The posterior mean (and standard deviation) estimates for the genetic correlations were 0.92 (0.02), 0.92 (0.03), 0.87 (0.05), 0.79 (0.07), 0.55 (0.10), 0.79 (0.07) and 0.35 (0.17) for PN, P120, P210, PC, CONF, CG and COL, respectively.

Keywords: *Beef Cattle, Genetic correlation, Sex, Growth, Carcass*

VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL Y DEL CROMOSOMA Y EN LA RAZA BOVINA PARDA DE MONTAÑA

Calvo, J.H.¹, Sanz, A.², Blanco, M.¹, Zaragoza, P.², Revilla, R.³, Villalba, D.⁴, Rodellar, C.² y Casaus, I.¹

¹CITA-Aragón ²Universidad de Zaragoza ³CTA ⁴Universitat de Lleida
jhcalvo@aragon.es

INTRODUCCIÓN

En el marco de un proyecto de investigación cuyos objetivos son la caracterización morfológica y genética de la raza Parda de Montaña se ha realizado la caracterización del ADN mitocondrial y de tres microsátélites del cromosoma Y. El ADN mitocondrial ha demostrado su utilidad en el análisis de la estructura poblacional de origen materno, debido a sus características de herencia materna, haploidía, y falta de recombinación. El análisis del ADN del cromosoma Y resulta de gran interés para estudiar la estructura poblacional de origen paterno. En este trabajo se muestran los resultados preliminares de diversidad del ADN mitocondrial, cromosoma Y, y relaciones filogenéticas de 8 poblaciones de ganado bovino Pardo de Montaña en el Pirineo aragonés.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN fue obtenido de 82 muestras de sangre de animales macho de la raza Parda de Montaña distribuidas en 8 zonas o valles Pirenaicos de Aragón: Valles de Castanesa y Baliera (n=12), Valle de Chistau (n=9), Valle del Aragón (n=6), Valle de Hecho (n=11), Valle de Tena (n=8), Valle de Benasque (n=12), Valle de La Garcipollera (n=12) y Valle de Broto (n=12). Se procuró que los animales muestreados no estuviesen emparentados y que mostraran caracteres de la raza en pureza.

El ADN total fue extraído usando el kit BloodPrep y el extractor de ácidos nucleicos 6100 Nucleic Acid Prepstation de Applied Biosystem. El ADN mitocondrial fue amplificado en un volumen final de 25 µl conteniendo 30 ng de ADN, 5 pmol de cada cebador (F-5' CCT ACG CAA GGG GTA ATG TA 3'; R-5' CCT GAA GAA AGA ACC AGA TG3'), 200 mM dNTPs, 2mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100 y 0,5 U Taq polimerasa y 0,25 U de Pfu (Biotools). Se realizaron 30 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 s, de hibridación a 55°C durante 30 s, y de extensión a 72°C durante 45 s. Los fragmentos resultantes fueron purificados mediante el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), y se secuenciaron con los cebadores anteriormente descritos.

Los índices de variación nucleotídica, estructura haplotípica, y test de neutralidad fueron calculados usando DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Se utilizó MEGA 2.0 para calcular la matriz de distancias entre poblaciones, y para construir árboles filogenéticos "neighbour joining", utilizando métodos de remuestreo "bootstrap" (Kumar *et al.*, 2001). El cálculo del estadístico F_{st}, así como la distribución de la variabilidad total encontrada entre poblaciones (AMOVA) se calculó usando el programa Arlequin (<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>). Finalmente, Network version 4.1.1.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>), se utilizó para establecer conexiones en red (median joining networks) entre los haplotipos de la muestra. Los microsátélites del cromosoma Y analizados fueron *BM861*, *BYM-1*, *INRA124* y *INRA189*. Se realizó un PCR multiplex usando el *Quiagen Multiplex PCR kit* combinando los oligonucleótidos marcados con cuatro fluorocromos diferentes (6-FAM, VIC, NED, PET). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C durante 15 m, 30 ciclos de amplificación con 15 s. de desnaturalización a 94°C, 30 s. de hibridación a una temperatura inicial de 65°C que se fue reduciendo a razón de 2°C cada 5 ciclos hasta alcanzar la temperatura final de hibridación de 55°C, 30 s. a 72°C, finalmente una etapa de elongación de 30 m. a 72°C. Los diferentes alelos fueron visualizados mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism 3130*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia analizada de 313 pares de bases de ADN mitocondrial mostró 33 haplotipos definidos por 31 sitios polimórficos, de los cuales 14 sólo fueron encontrados en un animal

(singletons). La diversidad nucleotídica y haplotípica encontrada fue elevada ($\pi = 0,006 \pm 0,003$; $Hd=0,890\pm0,028$). En la Tabla 1 se pueden ver los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica de las poblaciones analizadas. De los 33 haplotipos encontrados, 16 fueron haplotipos nuevos no descritos en la base de datos del GenBank, de los cuales 13 sólo aparecieron en un animal, 2 en 3 animales, y 1 en 5 animales (Figura 1).

Los índices de diferenciación genética mostraron que las poblaciones analizadas no se pueden considerar como poblaciones aisladas, con excepción de la población de la Garcipollera que mostró diferenciación genética ($p<0,05$) con todas las poblaciones excepto con los valles de Castanesa-Baliera y el Valle de Broto, que fueron las poblaciones que presentaron los índices de diversidad haplotípica más elevada. Estas poblaciones no presentaron diferencias significativas con ninguna población. El valle de Chistau también presentó diferencias significativas respecto a los de Broto, Benasque y La Garcipollera.

El análisis molecular de varianza (AMOVA), realizado teniendo en cuenta las 8 poblaciones, mostró que el 89,58% de la varianza total fue debida a diferencias genéticas entre individuos, mostrando una población mínimamente estructurada ($Fst= 0,104$), posiblemente asociado a un efecto valle.

Los índices de neutralidad fueron negativos y significativos para Fu 's Fs (-35,008; $p<0,0001$), Fu and Li 's F y $Tajima$'s D (-2,11204; $p<0,05$), y negativo pero no significativo para Fu and Li 's D (-2,2383; $p<0,10$), indicando una clara desviación de la neutralidad en la frecuencia de los alelos esperados, debido al excesivo número de alelos en baja frecuencia (Braverman *et al.*, 1995; Aris-Brosou y Excoffier, 1996). Esta baja frecuencia de mutaciones nuevas, puede ser un indicador de selección purificante o de expansión de la población tras un cuello de botella. El análisis de conexiones de red, que muestra una estructura filogenética de estrella (Figura 1), junto con los resultados de la distribución "mismatch", que resultó unimodal con el pico en la izquierda, se asocia con poblaciones que han sufrido una expansión demográfica reciente (Rogers y Harpending, 1992; Slatkin y Hudson, 1991).

En cuanto a los polimorfismos del cromosoma Y no se encontró variabilidad en los cuatro microsatélites analizados hasta el momento. En estos momentos se está buscando variabilidad en la población de Parda de Montaña en otros microsatélites del cromosoma Y (*UMN0307*, *UMN0103* y *BRY.1*).

Tabla 1. Índices de diversidad mitocondrial en las diferentes poblaciones de Parda de Montaña analizadas.

Poblaciones	N	H	Hd	π	k
Valle Castanesa – Baliera	12	8	0,924	0,005	1,773
Valle de Chistau	9	5	0,806	0,003	1,222
Valle del Aragón	6	4	0,867	0,003	1,200
Valle de Broto	12	7	0,773	0,004	1,333
Valle de Benasque	12	7	0,833	0,004	1,303
Valle de La Garcipollera	12	6	0,864	0,011	3,652
Valle de Hecho	11	8	0,927	0,008	2,582
Total	82	33	0,890	0,006	2,097

N: número de animales; H: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica; K: número medio de diferencias nucleotídicas entre secuencias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aris-Brosou, S. & Excoffier, L. 1996. *Molecular Biology Evolution* 13, 494–504.
- Braverman, J.M., Hudson, R.R., Kaplan, N.L., Langley, C.H. & Stephan, W. 1995. *Genetics* 140 (2), 783–796.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. 2001. *Bioinformatics* 17(12), 1244–1245.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. 1992. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552–569.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. *Bioinformatics* 19(18), 2496–2497.
- Slatkin, M. & Hudson, R.R. 1991. *Genetics* 129(2), 555–562.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RZ2006-0007 y cofinanciado con fondos FEDER. Los autores agradecen a J.M Macarulla y a la Asociación

de Criadores de la raza Parda de Montaña (ARAPARDA) por poner a nuestra disposición las muestras.

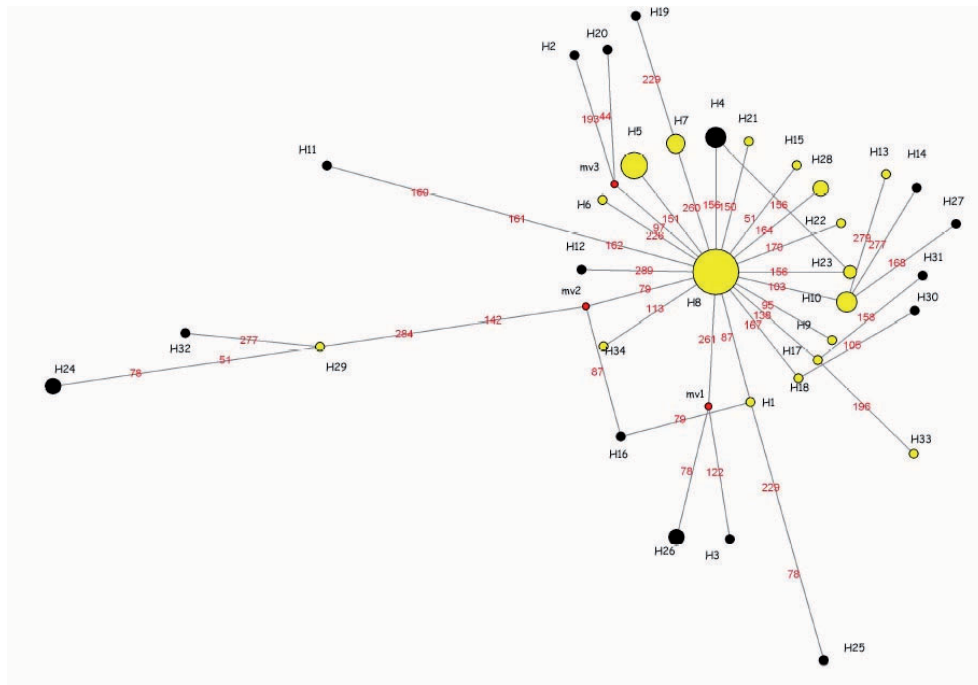


Figura 1. Análisis de conexiones de red (median-joining network). El diagrama muestra las conexiones entre haplotipos y la frecuencia de los mismos. El diámetro de H1 representa un animal. Los números indican la posición relativa del nucleótido mutado en relación a la secuencia. El haplotipo negro muestra haplotipos nuevos descritos en este estudio.

MITOCHONDRIAL AND Y CHROMOSOME DNA VARIABILITY IN PARDA DE MONTAÑA BREED

ABSTRACT: We have studied the genetic variability and relationship of eight populations of Parda de Montaña breed using mitochondrial DNA and four Y chromosome microsatellites (*BM861*, *BYM-1*, *INRA124* y *INRA189*). Y chromosome microsatellites showed monomorphics. Thirty- three mitochondrial haplotypes defined by 31 polymorphic sites (fourteen polymorphic sites were singletons) were found. The 17 phylogenetically informative sites were used to calculate nucleotide diversity ($\pi=0.006$) and haplotype diversity ($Hd=0.890$). A total of 16 previously undescribed haplotypes were found. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that 10.4% of the genetic diversity was attributable to differences among populations. *Fu's Fs* (-35,008; $p<0,0001$), *Fu* and *Li's F* and *Tajima's D* (-2,11204; $p<0,05$) indicated a clear deviation from the expected allele frequency spectrum, in this case due to an excess of rare alleles. The construction of median networks showed a clear star-like phylogeny around the most frequent haplotype. The negative *Tajima's D*, *Fu* and *Li's F* and *Fu's Fs* values, as well as expected mismatch distributions and median networks suggest a population expansion.

Keywords: *Bos taurus*, mitochondrial DNA, microsatellites, chromosome Y, Parda de Montaña, cattle.

MEDIDA DE LA CONEXIÓN ENTRE EXPLOTACIONES DE BOVINOS DE CARNE DE LA RAZA BRUNA DELS PIRINEUS

Tarrés, J.¹, Fina, M. y Piedrafita, J.

¹Grup de Recerca en Remugants, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona).

joaquim.tarres@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El mejor predictor lineal insesgado (BLUP) del valor genético permite comparaciones entre animales, pero solo cuando existen conexiones genéticas entre los diferentes ambientes (Fouilloux et al., 2008). Laloë (1993) definió la desconexión para los efectos aleatorios en términos de “no-predicibilidad” del contraste, es decir, cuando su coeficiente de determinación (CD) es nulo. Laloë y Phocas (2003) mostraron que tanto la reducción de la precisión como el sesgo potencial en una evaluación genética provocadas por la desconexión son debidas al mismo fenómeno de regresión hacia la media. Estos autores concluyeron que el CD era el mejor método para juzgar la precisión de una evaluación genética u optimizar los diseños correspondientes, especialmente cuando se tiene que tener en cuenta las relaciones genéticas entre animales a través de la matriz de parentesco. El problema es que el CD es difícil de calcular para evaluaciones genéticas rutinarias debido a las demandas de almacenamiento y tiempo de computación requerido para calcular la inversa de la matriz de coeficientes y la matriz de parentesco. Por tanto, es aconsejable utilizar medidas de conexión que estén muy correlacionadas con el CD, como la similitud genética entre explotaciones (Thoren Hellsten et al., 2008). El objetivo de este trabajo es la medida de conexiones entre explotaciones de vacuno de carne de la raza *Bruna dels Pirineus* en las que se practica casi en exclusividad la monta natural como método reproductivo. En concreto se calculará la similitud genética entre explotaciones y se establecerán conjuntos de explotaciones conectadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Similitud genética (Genetic Similarity, GS)

La similitud genética entre dos ganaderías es la proporción de la población con padres comunes y se calcula como proporción de descendientes de los padres con progenie en las dos explotaciones en relación con el número total de descendientes en las dos explotaciones (Rekaya et al., 2003). La similitud genética se calculó para las tres bases de datos que disponemos del Programa de Control de Rendimientos de la raza *Bruna dels Pirineus*. La base de datos de crías, con 46852 registros, nos permitió calcular la similitud genética debida a los padres (GS_padres) que se genera cuando dos explotaciones comparten toros. A partir de la base de datos de vacas, con 25915 registros, calculamos la similitud genética debida a los abuelos maternos (GS_am), la cual se genera cuando existe compraventa de hembras para la reposición entre explotaciones. La base de datos de toros, con 1353 registros, nos permitió calcular la similitud genética debida a los abuelos paternos (GS_ap) generada cuando existe compraventa de machos para reposición.

Selección de un conjunto de explotaciones conectadas

El objetivo práctico principal de los estudios de conexión es identificar conjuntos de explotaciones conectadas. Dos explotaciones se consideran conectadas si la GS es mayor que un valor umbral arbitrario a priori ω , que hemos fijado en el 5%. Asimismo, un grupo de explotaciones conectadas significaría que el grado de similitud de cualesquiera dos de ellas superaría este umbral. Esta agrupación puede alcanzarse a través de un procedimiento de clustering aglomerativo propuesto por Fouilloux et al. (2008). En nuestro trabajo, no obstante, aplicamos también un procedimiento más laxo, de forma que el índice de similitud de una explotación dada es igual a su mayor GS con las explotaciones actualmente en el cluster en lugar del menor GS. De esta forma, una explotación entra en el cluster si está conectada a una de las explotaciones dentro del cluster aunque no esté conectada a las otras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Similitud genética (GS)

De las 260 explotaciones que tenían registros en la base de datos de crías, 155 compartían toros con alguna otra explotación (GS debida a los padres). Las GS de las explotaciones conectadas oscilaron entre 0,09% y 100%, con una media de 20,87% y una mediana de 9,56%. Estos últimos valores están por debajo de los valores aconsejados por Kuehn et al. (2007) para minimizar el riesgo asociado con medias genéticas diferentes entre explotaciones, quienes sugieren que se debe aparear al menos un tercio de las hembras reproductivas a toros de conexión para reducir el sesgo a niveles aceptables. Sin embargo, la asimetría de la distribución de las GS indicaría que hay una minoría de explotaciones que estarían suficientemente conectadas, aunque haya una gran mayoría de explotaciones con conexiones más débiles.

Las conexiones debidas a las madres se cuantificaron calculando la GS debido a los abuelos maternos. De las 226 explotaciones estudiadas en la base de datos de vacas, había 154 explotaciones que tenían vacas con medias hermanas en alguna otra explotación. Las GS de las explotaciones conectadas oscilaron entre el 0,6 y el 100% con un promedio del 25,91% y una mediana de 17,86%. Estos valores son superiores a los valores obtenidos para las crías indicando que la compraventa de animales para la reposición es ligeramente superior al intercambio de toros entre explotaciones.

Finalmente, se calculó la GS debida a los abuelos paternos. De las 125 explotaciones que tenían registros en la base de datos de toros, había 68 que tenían toros con medios hermanos en alguna otra explotación. Las GS de las explotaciones conectadas oscilaron entre el 5 y el 100% con un promedio de 38,91% y una mediana de 33,33%. Estos valores son bastante altos aunque pueden ser debidos a un reducido número de animales.

Selección de un conjunto de explotaciones conectadas

En primer lugar se hizo una selección de explotaciones conectadas a través del abuelo materno aplicando un criterio laxo de GS (superior al 5%). Obtuvimos un gran cluster (con más de 50 explotaciones) entre las cuales existe movimiento de animales para la reposición (Figura 1). Fuera de este gran cluster hay toda una serie de pequeños clusters y explotaciones que no tienen conexión genética con otras explotaciones.

En segundo lugar, dentro del gran cluster de explotaciones conectadas, hicimos una selección de explotaciones conectadas de una forma más estricta. Cuando el criterio era la GS debido al abuelo materno, se obtuvieron clusters que contienen entre dos y cinco explotaciones. El tamaño de los clusters es todavía más pequeño (entre dos y tres rebaños) cuando la GS es debida a los padres. En este caso, la mayoría de las explotaciones dentro del mismo cluster están en la misma comarca. Estos pequeños clusters se pueden unir a través de la GS debido al abuelo paterno, lo cual da lugar a la aparición de tres conjuntos de clusters: el del Ripollés (A₁), el ligado a dos explotaciones de la comarca de Osona (BK y BL) y el ligado a una ganadería del Pallars Sobirà (FA). Además existe una explotación (ZG) que tiene abuelos paternos en común con los tres conjuntos de clusters y que podría servir para conectarlos.

En conclusión, hemos visto que hay una serie de explotaciones que no están conectadas genéticamente con ninguna otra explotación y hay un gran conjunto de explotaciones entre las cuales hay movimiento de animales y existe un cierto grado de GS. Ésta puede provenir de tres vías (compartir toros, compraventa de hembras para reposición y compraventa de machos para reposición). Además hay explotaciones que están conectadas por una vía pero no a través de las otras. El próximo paso será establecer un criterio que tenga en cuenta los tres tipos de conexiones a efectos de decidir qué grupo de explotaciones se evalúan juntas (en un mismo cluster). Una primera alternativa sería el CD de contrastes utilizado por Fouilloix et al. (2008). Estos autores estiman el CD por simulación a partir de un modelo padre debido a que en sus poblaciones se utiliza de forma importante la inseminación artificial, si bien en nuestro caso se tendría que hacer probablemente con un modelo animal para tener en cuenta las conexiones vía abuelo materno.

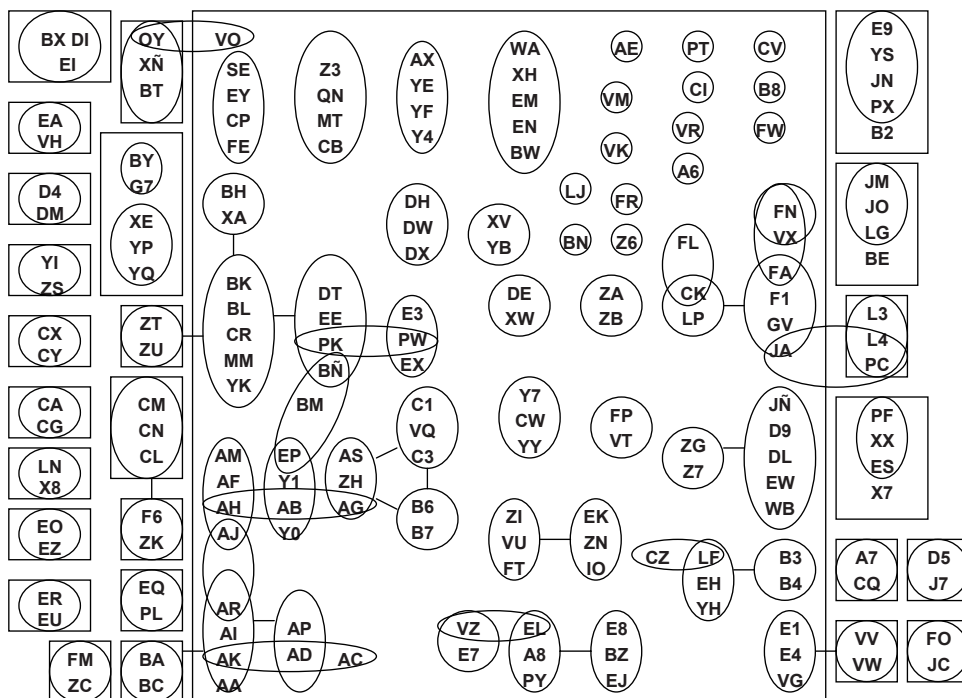


Figura 1. Clusters de explotaciones conectadas. Los clusters ovalados verticalmente (horizontalmente) fueron creados de manera estricta con una $GS_{am} > 5\%$ ($GS_{padre} > 5\%$). Los clusters cuadrados (conectados por una línea) fueron creados de manera laxa con $GS_{am} > 5\%$ ($GS_{ap} > 5\%$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fouilloux, M. N., Clément, V., & Laloë, D. 2008. *Genet. Sel. Evol.* 40: 145-159.
- Kuehn, L. A., Lewis, R. M., & Notter, D. R. 2007. *Genet. Sel. Evol.* 39: 225-247.
- Laloë, D. 1993. *Genet. Sel. Evol.* 25: 557-576.
- Laloë, D. & Phocas, F. 2003. *Livest. Prod. Sci* 80: 241-256.
- Rekaya, R., Weigel, K. A., & Gianola, D. 2003. *J. Dairy. Sci.* 86: 1837-1844.
- Thorén Hellsten, E., Jorjani, H., & Philipsson, J. 2008. *Livest. Sci.* 118: 147-156.

Agradecimientos: El programa de Control de Rendimientos ha sido financiado por el *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural*, con la inestimable aportación de los ganaderos de Februpi que han registrado la información.

MEASURING CONNECTEDNESS AMONG HERDS IN BEEF CATTLE UNDER NATURAL SERVICE

ABSTRACT: A procedure to measure connectedness among herds was applied to Bruna dels Pirineus beef cattle breed. It consists of two steps: (a) computing genetic similarity among herds; and (b) building sets of connected herds. Many of the herds were not connected with any other herd but there was a big set of herds with some degree of genetic similarity due to animal exchanges. Genetic similarity came from three different ways (sharing bulls and buying replacement females and males). Herds connected through sires had an average genetic similarity of 20.87%, but it was higher for herds connected through maternal grandsires and paternal grandsires (25.91% and 38.91%, respectively). Once the genetic similarity was calculated, small clusters of 2 to 5 herds were built using an agglomerative clustering method.

Keywords: connectedness, clustering, genetic similarity, beef cattle.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RAZA OVINA GUIRRA MEDIANTE 8 MARCADORES MICROSATÉLITES.

Viudes de Castro, M.P.¹, Grimal, A.¹, Vicente, J.S.², Moce, E.¹ y Gómez, E.A.¹

¹Centro de Tecnología Animal (CITA), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Polígono La Esperanza, 100. 12400 Segorbe. Castellón.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA). Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera s/n. 46071 Valencia.
e-mail: viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

La raza Guirra, también denominada Roja Levantina o "Sudat", es la única raza ovina autóctona de la Comunidad Valenciana. Con un censo de 3.640 hembras y 174 machos (Peris et al., 2002), hay que destacar que más de la mitad de la población actual se halla concentrada en sólo 6 rebaños (1.534 animales). En la actualidad está incluida en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España como raza pura de protección especial, según la Orden APA/661/2006. El control de la filiación en los pequeños rumiantes, es cada vez más utilizado por las Asociaciones de Ganaderos como complemento indispensable para verificar las inscripciones en el Libro Genealógico y para el correcto funcionamiento de los programas de Mejora Genética. (Lozano et al., 2002). De ahí que el objetivo del presente trabajo fue la caracterización genética preliminar de la raza ovina Guirra mediante el uso de una batería inicial de 8 microsatélites aplicados por primera vez en esta raza; que pueda facilitar la correcta identificación individual y el control de filiación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un muestreo de 96 machos de 16 explotaciones. Se tomaron muestras de sangre mediante punción en la vena yugular utilizando tubos de vacío Vacutainer TM con EDTAK3 como anticoagulante. Seguidamente las muestras de sangre fueron congeladas a -20 °C hasta su posterior procesado para la extracción de ADN. Se emplearon 8 microsatélites estructurados en dos reacciones multiplex (OarCP0049, OarFCB0304, INRA0063, HSC, INRA0005, MAF0065, McM0527 y D5S2), que se encuentran dentro del panel de marcadores ovinos recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, 2002).

La secuenciación de los productos de PCR se realizó con un secuenciador *CEQ™ 8000 Beckman Coulter* por electroforesis capilar con marcaje fluorescente.

EL número de alelos (k), la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) se estimaron con el programa GENETIX 4.03 (Belkhir et al., 2004). El contenido informativo del polimorfismo (PIC) así como las diferentes probabilidades de exclusión de la paternidad se estimaron con CERVUS 3.0 (Kalinowski et al, 2006). Para el cálculo de los valores de FIS así como los diferentes test de equilibrio Hardy-Weinberg se empleó el programa GENEPOP 4.0.6 (Raymond y Rousset, 1995), los test se realizaron con cadenas de Markov con un periodo de quemado de 10.000, con 100 tandas y 10.000 iteraciones por tanda. Los Análisis Factoriales de Correspondencia se realizaron con GENETIX 4.03 y la distancia DAS (Alele Shared Distance) entre individuos se calculó con POPULATIONS 1.2.03 (Langella, 2002), los árboles se visualizaron con TREEVIEW.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de variabilidad genética se muestran en la Tabla 1. Se han detectado un total de 77 alelos en los 92 individuos para los 8 microsatélites con 9,63 alelos por locus de promedio, variando entre 7 y 13 alelos por locus, este valor se encuentra por encima de la media del encontrado por Arranz et al. (1998) en razas ovinas españolas donde sólo la raza Merino supera a la Guirra con 9,9 alelos por locus, no obstante el panel de marcadores utilizado en nuestro trabajo es distinto al empleado por estos autores. En otro estudio realizado con parte de estos marcadores en la oveja Palmera se encontraron valores

inferiores para k (Martínez et al., 2005). La He alcanzó un valor de 0,762 y la Ho fue 0,705. Todos estos valores son de la misma magnitud a los encontrados en la bibliografía para otras razas ovinas, por lo que la raza Guirra, a pesar de estar catalogada como una raza de protección especial, parece conservar valores altos de variabilidad genética para estos marcadores.

Los test de equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 2) mostraron que hay dos loci con déficit de heterocigotos y uno con exceso. Para el test global, la población mostró un déficit de heterocigotos, por lo que no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

El valor promedio del PIC fue de 0,725 mostrándose todos los loci muy informativos ($PIC > 0,5$) siendo las probabilidades de exclusión del parentesco para esta batería de microsatélites elevadas. Así, la probabilidad de exclusión de la paternidad de un individuo no emparentado si se desconoce el genotipo del otro parental (PE_1) es de 0,9817, lo que se podría utilizar para identificar la correcta asignación de madres. La probabilidad de exclusión de la paternidad de un individuo no emparentado si se conoce el genotipo del otro parental (PE_2) es de 0,9989 y la probabilidad de exclusión de un par de parentales no emparentados (PE_{pp}) es de 0,999991. Por ello el panel de microsatélites estudiado se muestra eficaz para realizar pruebas de paternidad dentro de esta raza.

Tabla 1. Número de alelos (k), heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), contenido informativo de polimorfismo (PIC), FIS , probabilidad de exclusión de un parental no emparentado cuando se conoce el genotipo del otro parental (PE_2) y Rango del tamaño alélico.

Locus	k	Ho	He	PIC	FIS	PE ₂	Rango
OarCP49	8	0,600	0,744	0,701	0,196	0,531	84-142
OarFCB304	11	0,750	0,737	0,701	-0,018	0,531	142-188
INRA63	9	0,804	0,727	0,676	-0,106	0,490	171-188
HSC	13	0,797	0,885	0,865	0,100	0,754	261-289
INRA5	13	0,620	0,794	0,761	0,221	0,604	126-152
MAF65	8	0,756	0,824	0,787	0,083	0,629	127-143
McM527	8	0,607	0,672	0,633	0,098	0,451	165-179
D5S2	7	0,709	0,715	0,672	0,008	0,466	184-198
Resumen	9,63	0,705	0,762	0,725	0,063	0,9989	

Tabla 2: Test de equilibrio Hardy-Weinberg para cada uno de los 8 loci.

Locus	Déficit de Heterocigotos. (P-value)	Exceso de Heterocigotos (P-value)	Test Exacto (P-value)
OarCP49	0,007	0,993	0,089
OarFCB304	0,245	0,739	0,587
INRA63	0,954	0,047	0,643
HSC	0,021	0,976	0,261
INRA5	0,003	0,995	0,007
MAF65	0,098	0,903	0,167
McM527	0,334	0,695	0,015
D5S2	0,092	0,917	0,397
Global	0,006	0,9996	0,007

El análisis factorial de correspondencia (AFC, Leroy, 2008) aplicado a la población de moruecos estudiada muestran una estructura de la misma en tres grupos diferenciados (Figura 1a). Algo similar ocurre al calcular la distancia DAS entre individuos (Figura 1b). Al analizar cómo se distribuyen las distintas explotaciones en los grupos, 5 tienen individuos en los tres grupos (A, B y C), 4 en los grupos A y B, 2 en los B y C, 1 sólo en el B, y 4 sólo en el C. Este estudio preliminar que recoge casi el 50% de los moruecos adultos de esta población permite concluir que aún conserva una elevada variabilidad genética y que los

marcadores ensayados en las dos multiplex permiten llevar a cabo un test de filiación de utilidad en un posible programa de conservación y selección genética de esta raza. No obstante, es necesario incrementar el número de marcadores y el número de animales analizados y sería interesante analizar el ADN mitocondrial para definir genéticamente los orígenes de la raza Guirra.

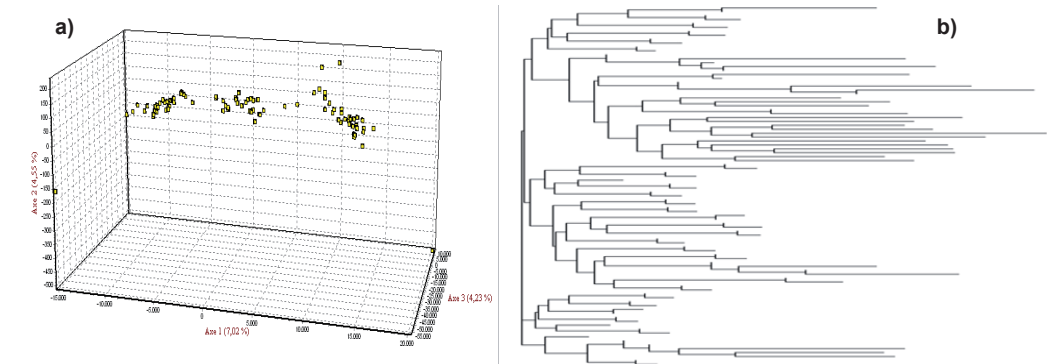


Figura 1. Análisis Factoriales de Correspondencia (a) y distancia DAS entre individuos (b) en la raza ovina Guirra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arranz, J.J., Bayón, Y. & San Primitivo, F. 1998. *Animal Genetics*, 29: 435-440.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. 1996-2004. <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. 2006. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099-1106.
- Langella, O. 2002. *Populations 1.2.30*. <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Leroy, G. 2008. *Diverité génétique et gestion génétique des races canines*. Thèse Doctorale. Agroparistech-INRA.
- Lozano, J.M., Bouzada, J.A., Pérez, E.M., Oliver, F., Tormo, B., Canals, A. & Montoro, V. (2002). XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).
- Martínez, A.M., Vega-Pla, J.L., Bravo, M.J., Barba, C., Caraballo, J. & Delgado, J.V. 2005. *Arch. Zootec.*, 54: 363-267.
- Peris, B., Corpa, J.M., Rodríguez, M., Ibor, I. & Lainez, M. 2002. XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. *GENEPOP* (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249 At <http://genepop.curtin.edu.au/> (26/06/2008).
- Treeview 1.6.6. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

GENETIC CHARACTERIZATION OF GUIRRA SHEEP USING EIGHT MICROSATELLITE MARKERS.

ABSTRACT: Ninety two rams from Guirra Sheep were genotyped for 8 microsatellite markers. Average number of alleles was 9.63. Average theoretical and observed heterozygosity were 0.762 and 0.705, respectively. The probabilities of paternity exclusion with 1 and 2 unconfirmed parents were 0.9817 and 0.99999, respectively. Genetic diversity level in this sheep breed is reasonably high and comparable with other Spanish sheep breeds. Correspondence factorial analysis showed a genetic structure of the population in three clusters. Genetic markers used in this study could be a valuable tool for both genetic resource banking and animal breeding programs in this breed.

Key words: genetic variability, microsatellite, Guirra Sheep

VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE POBLACIONES OVINAS DE RAZA RIPOLLESA

Esquivelzeta, C.¹, Fina, M.¹, Bach, R.², Madruga, C.¹, Caja, G.¹ y Piedrafita, J.¹

¹Grup de Recerca en Remugants, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, España.

²Associació Nacional de Criadors d'ovins de Raça Ripollesa (ANCRI).

Jesus.Piedrafita@uab.es

INTRODUCCIÓN

Más del 86% de los municipios españoles tiene alguna explotación ovina (Benito, 2007). Entre las razas utilizadas para producción de carne se encuentran los ovinos de raza Ripollesa, caracterizados por un perfil convexo y piel pigmentada con manchas negras, marrones o ambas, difusas en la cabeza y en las extremidades, de tamaño mediano, procedente del tronco entrefino. Entre las razas autóctonas españolas, la Ripollesa es la más común en Cataluña. La mayoría de los rebaños se encuentran localizados en el noreste (Guillaumet y Caja, 2001), principalmente en las provincias de Barcelona y Girona (Daza, 1997, Milán, 2003), si bien existe algún representante en la provincia de Teruel.

El incremento poblacional y la creciente demanda de alimentos llevó a que los ganaderos optaran por intensificar sus explotaciones e introducir razas foráneas, lo que fue en detrimento de algunas razas locales, cuya existencia llegó a ponerse en peligro (García, 1980, Oldenbroek, 1990). Para hacer frente a esta situación, la FAO recomienda establecer programas de conservación y mantenimiento de los recursos genéticos animales, cuyas primeras fases incluyen la descripción general de la población así como la caracterización racial cualitativa y cuantitativa, siendo la zoometría la herramienta adecuada para desarrollar esta última. Estudios previos (Avellanet, 2006, Kunene et al. 2007) han demostrado que las poblaciones ovinas pueden presentar diferencias biométricas entre rebaños y áreas geográficas que podrían condicionar el establecimiento del programa de mejora. En este sentido, el objetivo de este trabajo es caracterizar zoométricamente distintas poblaciones de ovinos de raza Ripollesa a efectos de evaluar su posible variabilidad morfológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se evalúa la morfología de hembras ovinas de la raza Ripollesa pertenecientes a ocho explotaciones procedentes de diferentes zonas geográficas. Se trata de verificar si existen diferencias entre topotipos tal y como han sugerido distintos estudios y ganaderos de las distintas zonas. En cada una de las explotaciones se eligieron al azar alrededor de 30 hembras. De cada animal se registró la edad, el peso (P) y se tomaron diferentes medidas zoométricas (MZ): perímetro torácico (PT), perímetro de la caña (PC), longitud de la cabeza (LC), amplitud de la cabeza (AC), longitud de la oreja (LO), longitud de la grupa (LG), amplitud de la grupa (AG), alzada a la cruz (AC), alzada a la espalda (AE), diámetro dorso-esternal (DDE), diámetro bicostal (DB) y diámetro longitudinal (DL). Se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) que nos permitió situar los individuos en el plano definido por los dos primeros factores, seguido de un análisis de *clusters*, el cual nos permitió establecer y comparar distintos grupos. Los datos se analizaron con ayuda del paquete estadístico SPAD (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los estadísticos descriptivos relativos a las diferentes MZ para el total de la población. La oveja Ripollesa tiene valores en general superiores comparados con las razas Canaria (Álvarez et al., 2000a), Gallega (Sánchez et al., 2000), Palmera (Álvarez et al., 2000b), Xisqueta (Avellanet, 2006), Yankasa y WAD (Salako, 2006), principalmente en AC, LG, AG y DL. El formato de la Ripollesa es muy similar al de la oveja Xisqueta y la Canaria, siendo de mayor formato que la oveja WAD.

El resultado del ACP nos indica que hay 3 factores principales que describen las MZ y la distribución que toman los individuos. El factor 1 (47,58% de la inercia total) corresponde al volumen del animal (perímetros y peso). El factor 2, que incluye el tamaño de los animales y la longitud de la oreja, y el factor 3, que describe el desarrollo de la grupa, representan el 12,31% y 7,69% de la inercia total respectivamente.

Tabla 1. Medidas zoométricas del total de las hembras (N = 224).

Medidas zoométricas	media	s.d.	mín.	máx
Perímetro torácico (cm)	90,41	6,62	75,00	108,00
Perímetro de la caña (cm)	8,61	0,59	7,50	10,00
Longitud de la cabeza (cm)	23,65	1,38	21,00	28,00
Amplitud de la cabeza (cm)	13,79	0,84	11,00	17,00
Longitud de la oreja (cm)	13,54	1,22	10,00	16,00
Longitud de la grupa (cm)	24,19	2,45	15,00	29,00
Amplitud de la grupa (cm)	21,80	1,87	16,00	29,00
Altura a la cruz (cm)	69,37	3,70	58,00	80,00
Altura a la espalda (cm)	68,19	3,52	56,00	77,00
Diámetro dorso-esternal (cm)	30,66	2,90	20,00	42,00
Diámetro bicostal (cm)	18,76	2,60	12,00	28,00
Diámetro longitudinal (cm)	75,63	4,65	43,00	85,00
Peso del animal (kg)	51,41	9,87	25,00	80,00

En la figura 1 se representan los individuos sobre el plano delimitado por los dos primeros ejes factoriales. En general se aprecia un alto grado de solapamiento entre las medidas zoométricas de los individuos de las distintas explotaciones, lo cual sugeriría un origen común, si bien se puede distinguir que las ovejas de Mas Muxach (1) son las más voluminosas, mientras que las de Semega (2) serían las de menores diámetros y peso. Por su parte, las ovejas de Montseny (7) y Las Parras de Martín (8) se diferenciarían por su mayor altura, situándose por debajo del plano los individuos con mayor longitud de oreja.

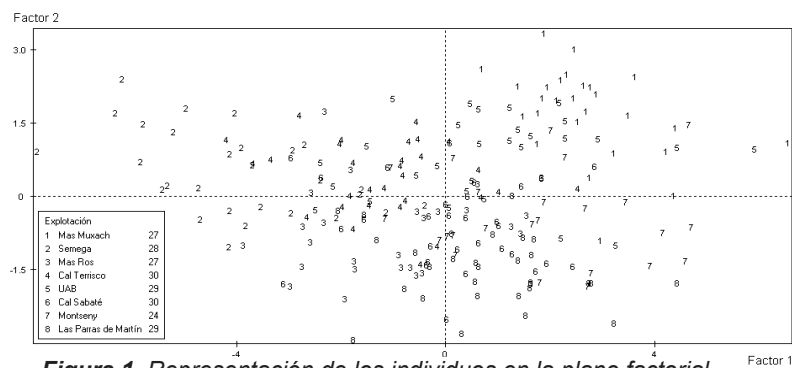


Figura 1. Representación de los individuos en la plano factorial

Las diferencias observadas resultado del análisis de *clusters*, nos permitieron distinguir los grupos cuyos valores medios para las distintas variables se presentan en la tabla 2. Dichos grupos son: 1. Mas Muxach y UAB, caracterizado por tener animales pesados y voluminosos; 2. Montseny y Las Parras de Martín, que incluyen animales con una altura superior a la media general; 3. Cal Sabaté, Cal Terrisco y Mas Ros, con animales de tamaño medio y longitud de oreja por encima de la media; y 4. Semega, que recoge a los animales de menor tamaño. Esta agrupación se explica en parte por los diferentes grupos de origen de los cuales derivan las explotaciones (Torre, 1991). Montseny y Las Parras de Martín tienen el mismo origen que Mas Muxach y UAB (topotipos Sant Hilari e Igualadino), pero se diferencian por una mayor altura. Cal Sabaté tiene su origen en los topotipos Sant Hilari y Queralpino, mientras Cal Terrisco deriva de la variedad Lluçanès. Finalmente, Mas Ros y Semega, de origen Queralpino se diferencian por el menor tamaño de las últimas. Las poblaciones han podido diferenciarse genéticamente desde su fundación por efectos de la deriva o bien por las prácticas selectivas que han sufrido a lo largo del tiempo, aunque las diferencias entre poblaciones de una misma raza pueden atribuirse a razones de manejo productivo y reproductivo del rebaño, ubicación geográfica y tipo de explotación (Avellanet, 2006; Kunene et al. 2007).

Tabla 2. Medias de diferentes medidas corporales y del peso de hembras pertenecientes a cuatro grupos de ovinos de raza Ripollesa.

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Número de animales	56	53	87	28
Perímetro torácico, cm	97,66 ^a	89,79 ^b	88,61 ^b	82,68 ^c
Perímetro de la caña, cm	8,83 ^a	8,67 ^{ab}	8,51 ^{bc}	8,38 ^c
Longitud de la cabeza, cm	23,63 ^a	24,94 ^b	23,34 ^a	22,18 ^c
Amplitud de la cabeza, cm	14,16 ^a	13,89 ^a	13,91 ^a	12,54 ^b
Longitud de la oreja, cm	13,15 ^a	14,00 ^b	13,70 ^b	12,96 ^a
Longitud de la grupa, cm	25,07 ^a	25,72 ^a	24,10 ^b	19,86 ^c
Amplitud de la grupa, cm	23,45 ^a	21,40 ^b	21,62 ^b	19,82 ^c
Alzada a la cruz, cm	70,00 ^a	71,90 ^b	68,75 ^a	65,25 ^c
Alzada a la región lumbo-sacra, cm	68,65 ^a	70,45 ^b	67,78 ^a	64,25 ^c
Diámetro dorso-esternal, cm	32,43 ^a	32,30 ^a	29,83 ^b	26,57 ^c
Diámetro bicostal, cm	21,50 ^a	18,76 ^b	17,48 ^c	17,27 ^c
Diámetro longitudinal, cm	76,46 ^{ab}	77,96 ^a	75,13 ^b	71,14 ^c
Peso, kg	59,85 ^a	54,88 ^b	48,22 ^c	37,94 ^d

Nota: Dentro de cada fila, las medias con la misma letra en el superíndice, no difieren significativamente ($p < 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, S., Fresno, M., Capote, J., Delgado, J. & Barba, C. 2000a. *Arch. Zoot.* 49: 209-215.
- Álvarez, S., Fresno, M., Capote, J., Delgado, J. & Barba, C. 2000b. *Arch. Zoot.* 49: 217-222.
- Avellanet, R. 2006. Tesis Doctoral. UAB. 282 pp.
- Benito, G.I. 2007. Unión de Peq. Agric. y Gan. Madrid. pp. 241-244.
- Daza, A. 1997. Mundi-Prensa. Madrid. 384 pp.
- FAO. 2007. Rome.
- García, D.M.A. 1980. *Agricultura y Sociedad.* 15: 115-162.
- Guillaumet, J. y Caja, G. 2001. *Ganadería.* 7 (I): 47-54.
- Kunene, N., Nesamvuni, E.A. & Fossey, A. 2007. *South African J. Anim. Sci.* 37 (1): 11-20.
- Milán, M.J., Arnalte, E. & Caja, G. 2003. *Small Rum. Res.* 49: 97-105.
- Oldenbroek, J.K. 1990. Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources. The Netherlands.
- Salako, A.E. 2006. *Int. J. Morph.* 24 (1): 13-18.
- Sánchez, L., Fernández, B., López, M. & Sánchez, B. 2000. *Arch. Zoot.* 49: 167-174.
- SPAD. 2002. Decisia. France.
- Torre, C. 1991. Tesis Doctoral. UAB. 262 pp.

Agradecimientos: El trabajo ha sido financiado por el *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya*, y por una beca CONACyT de la que disfruta Cecilia Esquivelzeta.

MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF RIPOLLESA SHEEP POPULATIONS

ABSTRACT: Among the autochthonous breeds in Spain, the Ripollesa sheep breed is the most common in Catalonia. It is rustic, with a convex profile, white wool of entrefine type and a characteristic pigmentation. Following the recommendations of the FAO, the morphologic characterization of the Ripollesa ewe has been carried out, as well as the analysis of its variability. A quantitative study from twelve zoometric measures and weight was carried out in a total of 224 females. The format of the Ripollesa breed is very similar to that of the Xisqueta and Canaria breeds, and has greater format than the Gallega and WAD sheep. Factor 1 (47,58%) describes volume, whereas factor 2 (12,31%) represents height and ear length. A cluster analysis allows us to differentiate four groups. The observed differences can be attributed to the selective history and origin of populations and to geographic location and management of the farm.

Keywords: *Ripollesa sheep, morphological variability, zoometric measures.*

VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN CINCO RAZAS OVINAS PIRENAICAS

Ferrando, A., Casas, M., Marmi, J., Parés, P.M. y Jordana, J.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici V; 08193-Bellaterra (Barcelona). Jordi.Jordana@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El ADN mitocondrial posee una serie de características como la haploidía, la herencia materna y la falta de recombinación que lo convierten en una herramienta muy útil en estudios sobre el origen materno de las poblaciones domésticas. Actualmente, hay descritos cinco haplogrupos mitocondriales en ovino doméstico (*Ovis aries*) denominados A, B, C, D y E (Meadows et al., 2007). Los ovinos ibéricos se clasifican, según características morfológicas —especialmente el tipo de lana—, en cuatro troncos: *churro*, *ibérico*, *merino* y *entrefino*. El haplogrupo mitocondrial B, o haplogrupo europeo, es el más comúnmente extendido en los cuatro troncos. El haplogrupo A, o haplogrupo asiático, también se presenta en baja frecuencia en razas de los distintos troncos, mientras que el haplogrupo C, ha sido detectado en tan sólo algunos individuos de unas pocas razas (Pereira et al., 2006; Pedrosa et al., 2007).

En la zona de los Pirineos y pre-Pirineos Centrales y Orientales existen razas ovinas con diferente origen ancestral, como las razas Aranese, Ripollesa, Xisqueta en la vertiente española, o Tarasconese y Roja de Rosellón en la francesa. La raza Aranese está estrechamente emparentada con la raza Tarasconese y sus orígenes ancestrales se encuentran probablemente en la raza Merina. La oveja Ripollesa tiene su origen en cruces entre ovejas autóctonas de los Pirineos Centrales y ovinos trashumantes mejorados de la raza Merina, aunque también ha recibido influencias de otras razas ibéricas y extranjeras (<http://www.rac.uab.es>). La raza Xisqueta, en cambio, pertenece al *tronco ibérico*. La oveja Roja de Rosellón, por su lado, desciende de poblaciones originarias del norte de África. El análisis con marcadores microsatélites mostró que estas cinco razas tienen una elevada variabilidad genética y una diferenciación genética poco pronunciada, siendo la oveja Aranese y la Tarasconese las razas más cercanas y la Roja de Rosellón la más distante (Ferrando et al., 2007). En este trabajo se pretende estudiar la diversidad mitocondrial en estas cinco razas de la zona de los Pirineos Centrales y Orientales

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN fue obtenido de muestras de sangre de animales de la raza Aranese (N=40), Tarasconese (N=18), Ripollesa (N=21) y Roja de Rosellón (N=13). Se procuró que los animales muestreados no estuviesen emparentados y que mostraran caracteres de la raza en pureza. Se incluyó asimismo una muestra de 16 secuencias de la raza Xisqueta obtenidas anteriormente (Marmi et al., 2007).

Se amplificó parte del DNA mitocondrial y del gen tRNA-Phe con los cebadores OarMtF1 (5' – TAC AAC ACG GAC TTC CCA CTC C – 3') y tRNA-Phe (Hiendleder et al., 2002) que producen un fragmento de 1144 pares de bases, que engloban desde la posición 15521L a la posición 48H de la secuencia de referencia AF010406 (Hiendleder et al., 1998). Los productos de PCR fueron purificados con el kit *Exo-SAP-IT™* (GE Healthcare) y secuenciados con *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) utilizando el cebador interno HC3-b (5' – CAG ACG GCC ATA GCT GAG TCC AAG – 3') que hibrida entre las posiciones 16314H-16337H de la secuencia de referencia. Las reacciones de secuenciación fueron purificadas con el kit *Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup* (Millipore) y secuenciadas en un ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron analizadas con el programa *Sequencing Analysis v.5.1.1* (Applied Biosystems) y alineadas con el programa *BioEdit v.7.0.5.1* (Hall, 1999). Se utilizó el programa *DnaSP v.4.5* (Rozas et al., 2003) para calcular los valores de diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (Hd) para cada raza, así como el número medio de diferencias entre secuencias (*mismatch distribution*). El programa *Network v.4.5.1.0*. (Fluxus

Technology Ltd) permitió construir el *median joining network* con todas las secuencias, incluyendo y excluyendo la región repetitiva del *D-loop*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se alineó un fragmento de 425-500 pares de bases de las 108 secuencias obtenidas. Todas las secuencias presentaron cuatro unidades repetitivas de 75 pares de bases excepto un individuo de la raza Ripollesa que sólo presentó tres. Esta secuencia fue excluida de la mayoría de los análisis, excepto en los que no se consideró la región repetitiva. Variaciones en el número de unidades repetitivas no son un hecho raro, y han sido también observadas en la raza Xisqueta (datos propios) y otras razas ibéricas (Pereira et al., 2006).

La *mismatch distribution* de las secuencias presentó una distribución bimodal, señal de la presencia de haplotipos divergentes. Casi todas las secuencias analizadas se agruparon con el haplogrupo mitocondrial B, excepto dos secuencias de la raza Aranesa que resultaron pertenecer al haplogrupo A. El individuo de la raza Ripollesa con tres unidades repetitivas también resultó pertenecer al haplogrupo A. El hallazgo de este haplogrupo asiático no es extraño pues también se encuentra en baja frecuencia en otras razas de los distintos troncos ibéricos y geográficamente distanciadas (Pereira et al., 2006; Pedrosa et al., 2007). Cabe destacar que, al contrario de lo que sucede en otras razas del *tronco ibérico* (Ojalada y Montesina) en las que se ha detectado hasta tres haplogrupos distintos (Pedrosa et al., 2007), la raza Xisqueta sólo presentó el haplogrupo B (Marmi et al., 2007).

La diversidad haplotípica fue muy elevada en las cinco razas (Tabla 1). Algunos haplotipos fueron compartidos por no más de dos individuos, generalmente de una misma raza. Pese a estar más estrechamente emparentadas, sólo se encontró un haplotipo común entre las razas Aranesa y Tarasconesa. No obstante, la Aranesa también compartió algún haplotipo con las razas Ripollesa y Xisqueta. Por otro lado, la raza Roja de Rosellón compartió un haplotipo con la raza Xisqueta. La diversidad nucleotídica fue más elevada en la raza Aranesa, en gran parte debido a la presencia de secuencias de dos haplogrupos. Tras excluir las secuencias del haplogrupo A, la raza presentó valores de diversidad nucleotídica y de diferencias medias entre secuencias más parecidos a las demás razas, pero también más elevados ($\pi=0,01840$, $k=8,889$). El *median-joining network* no permitió detectar ninguna estructura clara entre las secuencias de las cinco razas (Figura 1A). Se repitió el *median-joining network* sobre un fragmento común de 199 pares de bases en 108 secuencias, excluyendo la zona repetitiva. En este caso, el *network* presentó una forma típica estrellada, con un haplotipo central muy frecuente compartido por todas las razas, y no se apreció ninguna subestructuración definida en las distintas razas (Figura 1B).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferrando, A., Parés, P. M., Marmi, J., Avellanet, R. & Jordana, J. 2007. *ITEA* 28 (vol. extra): 516-518.
- Fluxus Technology Ltd., <http://www.fluxus-engineering.com>.
- Hall, T. A. 1999. *Nucl. Acids Symp. Res.* 41: 95-98
- Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R. & Janke, A. 1998. *J. Mol. Evol.* 47: 441-448.
- Hiendleder, S., Kaupe, B., Wassmuth, R. & Janke, A. 2002. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269: 893-904.
- Marmi, J. & Jordana J. 2007. *Arch. Zootec.* 56 Sup.1: 429-434.
- Meadows, J. R. S., Cemal, I., Karaca, O., Gootwine, E. & Kijas, J. W. 2007. *Genetics* 175: 1371-1379.
- Pedrosa, S., Arranz, J. J., Brito, N., Molina, A., San Primitivo, F. & Bayón, Y. 2007. *Genet. Sel. Evol.* 39: 91-103.
- Pereira, F., Davis, S. J. M., Pereira, L., McEvoy, B., Bradley, D. G. & Amorim, A. 2006. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1420-1426.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- San Primitivo, F., Pedrosa, S., Arranz, J. J., Brito, N. V., Molina, A. & Bayón, Y. 2007. *Arch. Zootec.* 56 (S1): 455-460.
- <http://www.rac.uab.es>.

Tabla 1. Parámetros de variabilidad mitocondrial en las cinco razas pirenaicas.

Razas	N	π	k	H	Hd	Haplotipo A	Haplotipo B
Aranesa	40	0,02253	10,768	34	0,992	2	38
Tarasconesa	18	0,01525	7,562	17	0,993	0	18
Ripollesa	20*	0,01587	7,905	17	0,984	0*	20
Xisqueta	16	0,01537	7,533	15	0,992	0	16
Roja de Rosellón	13	0,01756	8,744	13	1,000	0	13
Total	107	0,01825	8,575	92	0,997	2*	105

N, número de animales; π , diversidad nucleotídica; número medio de diferencias nucleotídicas entre secuencias; H, número de haplotipos; Hd, diversidad haplotípica.

* No incluye una secuencia del haplogrupo A con tres unidades repetitivas.

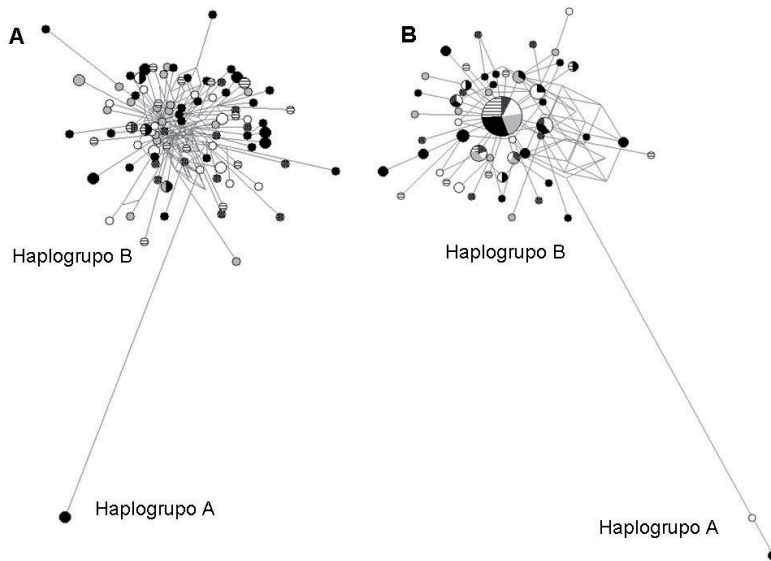


Figura 1. Median-joining network de las secuencias mitocondriales de las razas Aranesa (negro), Tarasconesa (gris claro), Ripollesa (blanco), Xisqueta (rayas) y Roja de Rosellón (gris oscuro): **A**, incluye la zona repetitiva; **B**, no incluye la zona repetitiva.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el *Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya*. También agradecemos a los ganaderos y a las diferentes asociaciones de las razas su ayuda y colaboración.

MITOCHONDRIAL DNA VARIABILITY IN FIVE PYRENEAN SHEEP BREEDS

ABSTRACT: The DNA mitochondrial variability of the control region was analysed in five sheep breeds located in the Pyrenean and pre-Pyrenean area: Aranese, Tarasconese, Xisqueta, Ripollese, and Roussillon Red. All breeds showed high levels of haplotype diversity, and all but three individuals belonged to haplogroup B, except two Aranese and one Ripollese animals that had sequences from haplogroup A. The median joining network constructed including and excluding the repetitive region did not show any clear phylogenetic structure among breeds.

Keywords: *Ovis aries*, D-loop, mitochondrial haplogroups, median joining network.

BÚSQUEDA DE QTL CON INFLUENCIA SOBRE PROLIFICIDAD EN EL GANADO OVINO DE RAZA CHURRA: ANÁLISIS DEL CROMOSOMA 26.

Gutiérrez-Gil, B., Sánchez, J.P., de la Fuente, L.F., Bayón Y., San Primitivo, F. y Arranz J.J. Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. E-mail: beatriz.gutierrez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la asociación nacional de criadores de raza Churra, ANCHE, ha iniciado un programa de mejora genética, dirigido a rebaños de aptitud cárnica, con el objetivo de incrementar el número de corderos nacidos vivos o prolificidad. En la oveja Churra este carácter muestra variabilidad, pero tiene una heredabilidad baja (Gutiérrez et al., comunicación personal), por lo que se espera una respuesta lenta a la selección.

Nuestro grupo de investigación inició hace años un barrido del genoma ovino en una población de ganado Churro de aptitud láctea para la detección de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) con influencia sobre caracteres de interés económico, tales caracteres de producción láctea y morfológicos (Gutiérrez-Gil et al., 2007; 2008a; 2009). El objetivo de este proyecto, y de los estudios de mapeo fino posteriores, es incluir la información molecular en el esquema de selección, a través de un programa de Mejora Asistida por Marcadores o Genes (MAS o GAS). Este objetivo resulta de especial interés en caracteres de baja heredabilidad, como la prolificidad.

La prolificidad es un carácter que se mide en ganado ovino, tanto de aptitud cárnica como láctea. Así, la estructura y la información genotípica utilizadas en la búsqueda de QTLs previamente mencionada resultan apropiadas para identificar regiones cromosómicas que controlan este carácter en ganado ovino de raza Churra. El cromosoma 26 contiene el gen que codifica para el receptor de la melatonina 1A (*MTNR1A*), relacionado con la estacionalidad reproductiva y la prolificidad en ciertas razas ovinas (Pelletier et al., 2000; Chu et al., 2003). En el presente trabajo se plantea el análisis de este cromosoma para identificar posibles regiones genómicas relacionadas con la prolificidad en la oveja Churra.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño experimental utilizado ha sido el denominado “diseño hija” utilizando animales pertenecientes al Núcleo de Selección de ANCHE. Se analizaron un total de 772 animales correspondientes a 11 familias de medio-hermanas y 14 granjas de la región de Castilla y León. Se han genotipado un total de 4 microsatélites localizados uniformemente a lo largo del cromosoma 26: BMS2168, BM6526, CSSM43, BM203. La metodología de genotipado utilizada se ha descrito en detalle con anterioridad (Gutiérrez-Gil et al., 2008a).

El fenotipo analizado en el presente estudio ha sido el número de corderos nacidos vivos por oveja y parto, a partir de los registros de la base de datos de ANCHE. Como variable dependiente del análisis de QTL se utilizaron las *Yield deviations* (YD), estimadas a partir de los datos brutos de prolificidad y tras la corrección de los mismos para todos los factores ambientales que contribuyen de forma significativa a la varianza del carácter en un modelo animal de repetibilidad: orden de parto, edad de la oveja, rebaño-año-estación y el efecto ambiental permanente de la oveja. El mapa de ligamiento construido con el programa CRIMAP (Green et al., 1990) para el cromosoma 26 ha sido descrito previamente (Gutiérrez-Gil et al., 2008b). El análisis de QTLs se llevó a cabo con el programa informático HSQM (Coppeters et al, 1998), que implementa el análisis de regresión con marcadores múltiples (Knott et al, 1996). Los valores de significación chromosome-wise fueron determinados mediante permutaciones de los valores fenotípicos (Churchill y Doerge, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de regresión realizado en el cromosoma 26 puso de manifiesto la existencia de un posible QTL en la segunda mitad del cromosoma en dos de las familias analizadas en nuestro estudio (análisis intrafamiliar). En la familia 11, el efecto detectado resultó significativo al nivel del 5% chromosome-wise (p_c -value = 0.044), con el pico del QTL localizado en la región 63-67 cM, dentro del intervalo [CSSM43-BM203]. Para la familia 10,

el posible QTL se detectó a un nivel de significación del 10% chromosome-wise (p_c -value = 0.093). En este caso los valores máximos del perfil estadístico se alcanzaron en el extremo distal del cromosoma (85-91 cM), cerca del marcador BM203. En el resto de las familias analizadas no se detectó ningún efecto significativo. En el análisis global de toda la población (análisis *across-family*), los valores del estadístico alcanzaron su máximo en la región 75-76 cM, dentro del intervalo [CSSM43-BM203], aunque sin resultar la significativos (p_c -value = 0.388). La figura 1 muestra el perfil estadístico obtenido en el análisis intrafamiliar a lo largo del mapa del cromosoma 26, para las dos familias segregantes del posible QTL identificado. El efecto de sustitución alélica del QTL fue similar en estos dos grupos de medio-hermanas, con un valor de 0.2 corderos por parto, lo que equivale a 0.42 desviaciones típicas fenotípicas de los datos corregidos por los factores fijos.

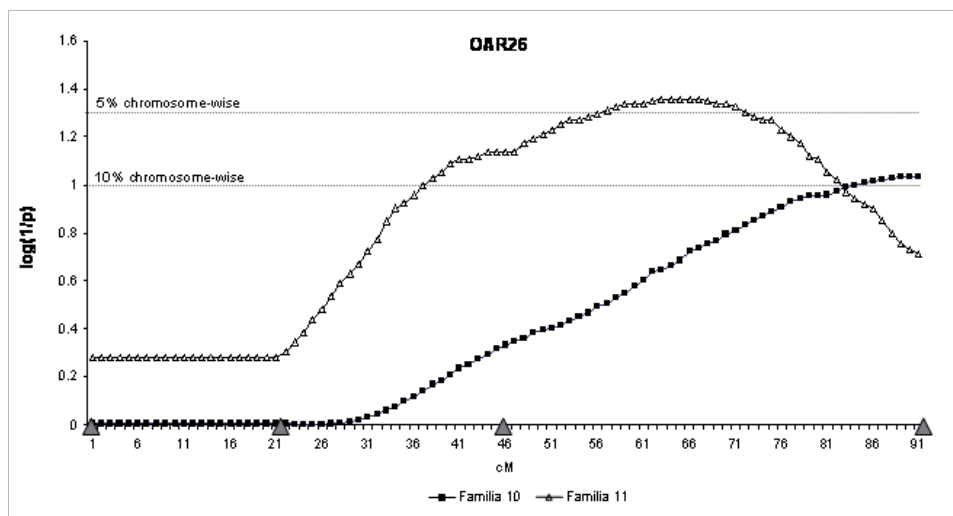


Figura 1. Distribución de los valores del test estadístico expresado como $\log_{10}(1/P)$ para el carácter prolificidad en el cromosoma OAR26 para las familias 10 y 11 (análisis intrafamiliar). Las líneas horizontales representan los umbrales de significación del 5 y del 10% chromosome-wise. Los triángulos grises en el eje de las abscisas indican las posiciones de los marcadores microsatélites analizados.

En el ganado ovino se han descrito un importante número de genes mayores que influyen de manera drástica en la tasa de ovulación (Davis, 2005). La prolificidad es un carácter complejo que depende tanto de la tasa de ovulación, como de otros factores que influyen en la supervivencia de las crías (Hanrahan y Quirke, 1985). Para la población considerada en este estudio, la heredabilidad calculada en base al modelo descrito para el cálculo de las YD fue de 0.025, mientras que la varianza fenotípica (σ_p^2) fue de 0.23. Aunque nuestro análisis no identificó ningún QTL significativo al nivel general de toda la población, dos de las familias analizadas mostraron efectos significativos en el análisis intrafamiliar en la segunda mitad del cromosoma. El gen *MTNR1A*, localizado en la primera mitad del cromosoma ovino 26, ha mostrado efectos significativos sobre la prolificidad en una raza ovina china (Chu et al., 2003). Si bien el efecto detectado en este análisis no se localizó en la región del gen candidato considerado, *MTNR1A*, hay que tener en cuenta la baja precisión, en cuanto a la posición estimada del QTL, que caracteriza a los análisis de ligamiento realizados con baja densidad de marcadores, como el caso del presente estudio. Con el objetivo de conseguir una mayor precisión, sería deseable incrementar la densidad de marcadores analizados en este grupo de ligamiento, si bien, este cromosoma no parece *a priori* un candidato en el que centrar futuros esfuerzos de mapeo fino en relación al carácter prolificidad. En cuanto a los

resultados de QTL obtenidos para el resto de caracteres analizados en esta misma población, es de destacar que en la misma región cromosómica del QTL aquí descrito se identificó un efecto para inserción de la ubre (Gutiérrez-Gil et al., 2008a). En relación a caracteres reproductivos no se ha descrito ningún QTL en esta región del genoma ovino. En la región ortóloga bovina, localizada en el cromosoma bovino 27, se ha identificado un QTL para el carácter facilidad de parto, cerca del marcador CSSM43 (Ashwell et al., 2005)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Ashwell, M.S., Heyen, D.W., S  ller, J.I., Ron, M., Sonstegard, T.S., Van Tassell, C.P & Lewin, H.A., 2005. *J Dairy Sci.* 88, 4111-4119.
- Chu, M.X., Ji, C.L. & Chen, G.H., 2003. *Asian Australas J Anim Sci* 16, 1701-1704.
- Churchill, G.A. & Doerge, R.W., 1994. *Genetics*. 138, 963-971.
- Coppieters, W., Kvasz, A., Farnir, F., Arranz, J.J., Grisart, B., Mackinnon M. & Georges M., 1998. *Genetics*, 149: 1547-1555.
- Davis, G.H., 1995. *Genet Sel Evol.* 2005;37 Suppl 1:S11-23.
- Green, P., Falls, K. & Crooks, S., 1990. Doc. for CRIMAP.
- Gutiérrez-Gil, B., El-Zarei, M. F., Bayón, Y., de la Fuente, L. F., San Primitivo, F. & Arranz J. J., 2007. *J Dairy Sci* 90, 422-426.
- Gutiérrez-Gil B, El-Zarei MF, Alvarez L, Bayón Y, de la Fuente LF, San Primitivo F, Arranz JJ., 2008a. *J Dairy Sci.* 91, 3672-3681.
- Gutiérrez-Gil B., Arranz J. J., El-Zarei M.F., Álvarez L., Pedrosa S., San Primitivo F., Bay  n Y., 2008b. *J Anim Breed Genet* 125, 201-204.
- Gutiérrez-Gil B, El-Zarei MF, Alvarez L, Bay  n Y, de la Fuente LF, San Primitivo F, Arranz JJ., 2009. *Anim Genet.* In press.
- Maddox J.F., Davies K.P., Crawford A.M., Hulme D.J. et al., 2001. *Genome Res.* 11:1275-1289.
- Hanrahan J.P., Quirke J.F., 1985. Contribution of variation in ovulation rate and embryo survival to within breed variation and litter size. In: *Genetics of Reproduction in Sheep*. Land, R.B. and D.W. Robinson (Eds.). Butterworths, London. pp. 193-201.
- Knott S.A., Essen J.M. & Haley C.S., 1996. *Theoret Appl Genet.* 93, 71-80.
- Pelletier J., Bodin L., Hanocq E., Malpoux B., Teyssier J., Thimonier J., Chemineau P., 2000. *Biol. Reprod.* 62:1096–1101.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el proyecto AGL2005-04321 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y del Proyecto GR43 de la Junta de Castilla y León para grupos de excelencia. B. Gutiérrez Gil disfruta de un Contrato Juan de la Cierva (MICINN).

SEARCH OF QTL UNDERLYING PROLIFICACY IN SPANISH CHURRA SHEEP: ANALYSIS OF CHROMOSOME 26.

ABSTRACT: In the last years the Association of Churra sheep breeders, ANCHE, has started a breeding program addressed to lamb producers with the aim of improving traits of interest in meat production. Prolificacy is an interesting trait in sheep meat production and because of its low heritability the selection for this program could take advantage of the implementation of molecular information. Our research group has previously carried out a genome scan to detect QTL influencing traits of interest in dairy Churra sheep. The molecular information derived from that project could be implemented into the breeding program through a Marker- or Gene- Assisted Selection Program (MAS or GAS). This is of special interest for those traits showing low heritabilities, such as prolificacy. Following a daughter-design, we have analysed sheep chromosome 26 to identify QTL for prolificacy, taking advantage of the information previously generated in the above commented genome scan. This chromosome was selected because it harbours the gene coding for the melatonin receptor 1A (*MTNR1A*), which has been found to be associated to reproductive seasonality and prolificacy in certain sheep breeds. Two of the 11 half-sib families analysed showed significant effects for the considered trait in the second part of the chromosome, between markers CSSM43 and BM203. However, this effect was not identifiable when the whole population was analysed. The position of the putative QTL identified in these two families was not coincident with the *MTNR1A* gene, and therefore this preliminary chromosome screening suggests that this gene does not have an important influence on Churra sheep prolificacy.

Keywords: sheep, prolificacy, QTL, OAR26

IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL CROMOSOMA Y EN LA ESPÈCIE CAPRINA

Vidal, O.¹, Pérez-Serra, A.¹, Badaoui, B.², Capote, J.³, Martínez, A.⁴, Delgado, J.⁴, Pla, C.¹ y Amills, M.²

¹ Departament de Biologia, Universitat de Girona, Girona 17071; ² Departament de Ciència animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona; ³ Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna 38108, Tenerife; ⁴ Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba 14071.

INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha, los estudios sobre domesticación del ganado caprino se han realizado mediante el análisis de haplotipos mitocondriales, que se han agrupado en 6 linajes y demuestran la existencia de una baja estructura filogeográfica y de al menos dos puntos de domesticación distintos localizados en el Creciente Fértil y el Valle del Indo (Luikart et al., 2001, Naderi et al., 2007). La reciente secuenciación de muestras fósiles del yacimiento de Baume d'Oullen (Francia) ha demostrado la coexistencia de dos linajes muy divergentes (A y C) sugiriendo procesos migratorios muy antiguos (al menos 7.000 YBP) y que afectaban a poblaciones considerablemente alejadas de los puntos de domesticación mas probables (Fernández et al., 2006). El análisis de un panel de microsátelites en 1426 cabras de 45 razas Europeas y de Oriente Próximo ha revelado, a diferencia de los estudios con marcadores mitocondriales, la existencia de una cierta estructura poblacional (FST medio = 0.07) y cuatro grupos fundamentales de razas (Oriente Próximo, Mediterráneo Central, Mediterráneo Occidental y Europa del Norte y Central).

Desde un punto de vista poblacional, el análisis del polimorfismo del cromosoma Y resulta de gran interés debido a la ausencia de recombinación y a su reducido tamaño efectivo. Sin embargo, prácticamente no se conoce nada acerca de la variabilidad del cromosoma Y en razas caprinas, habiéndose realizado un único estudio centrado en determinar la filogenia del género *Capra* (Pidancier et al., 2006).

En el presente trabajo, se ha planteado caracterizar el polimorfismo del cromosoma Y caprino mediante la secuenciación parcial de 4 loci en individuos pertenecientes a distintas razas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo DNA genómico, a partir de muestras de pelo procedentes de 8 machos de la raza Malagueña, 5 de Murciano-Granadina, 8 de Saanen y 1 macho de raza Tibetana, mediante el kit *Nexttec™ Genomic DNA Isolation* (Nexttec GmbH Biotechnologie, Leverkusen, Alemania).

Cinco pares de primers (ver Tabla 1) fueron utilizados para amplificar las distintas regiones candidatas de los genes *AMELY*, *DBY*, *UTY* y *ZFY*. Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante el kit *Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Barcelona, España) y posteriormente secuenciados con el *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Madrid, España). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un equipo *ABI 3130 Genetic Analyzer* de cuatro capilares (Applied Biosystems, Madrid, España), y las secuencias obtenidas se alinearon con el programa Multalin (Corpet 1988) con la finalidad de detectar posiciones polimórficas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se han analizado 5 regiones del cromosoma Y, de las cuales 3 presentan polimorfismo (ver Tabla 1). De estos polimorfismos, 2 son cambios puntuales de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* o SNP) localizados en la región 3'UTR del gen *DBY* y en el intrón 5 del gen *ZFY*; mientras que el tercero es una delección de 4 nucleótidos

en una región de repeticiones AT en tándem del intrón 4 del gen *AMELY*. En el conjunto de los animales analizados se ha detectado 3 haplotipos, H1, H2 y H3 (ver Tabla 2).

En un trabajo similar en oveja, Meadows et al. (2006), describen hasta 11 haplotipos distintos en 65 razas de todo el mundo mediante el empleo de cinco marcadores de cromosoma Y. En razas ovinas Europeas, sin embargo, el número de haplotipos se reduce a 4, y en razas ovinas españolas sólo se encuentra un único haplotipo. Aunque en nuestro trabajo el número de individuos y regiones analizadas es menor que el de Meadows et al. (2006), se observa que la diversidad haplotípica detectada en caprino es similar a la descrita en la especie ovina.

Pindancier et al. (2006), mediante la secuenciación de dos regiones de los genes *AMELY* y *ZFY* (diferentes de las analizadas en este trabajo), identificaron dos haplotipos (C1 y C2) en cabras domésticas. Resultados preliminares de secuenciación de esta región *AMELY* en el material animal empleado en el presente trabajo indican que los haplotipos H1 y H3 se corresponden con C1, mientras que H2 se corresponde con C2. Un objetivo de futuro consistiría en ampliar el número de individuos y de razas analizadas, así como secuenciar nuevas regiones de cromosoma Y con la finalidad de detectar nuevos haplotipos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bollongino, R., Elsner, J., Vigne, J.D. & Burger J. 2008. PLoS ONE 3(10):e3418.
- Cañón, J., García, D., García-Atance, M.A., Obexer-Ruff, G., Lenstra, J.A., Ajmone-Marsan, P., Dunner, S., ECONOGENE Consortium. 2006. Anim Genet 37:327-34
- Corpet, F. 1988. Nucl Acids Res 16:10881-10890
- Fernández, H., Hughes, S., Vigne, J.D., Helmer, D., Hodgins, G., Miquel, C., Hänni, C., Luikart, G. & Taberlet P. 2006. Proc Natl Acad Sci 103:15375-9.
- Goetting-Minesky, M.P. & Makova KD. 2006. J Mol Evol. 63:537-44.
- Hellborg, N. & Ellegren, H. 2003. Mol Ecol 12:283-291
- Luikart, G., Gielly, L., Excoffier, L., Vigne, J.D., Bouvet, J. & Taberlet, P. 2001. Proc Natl Acad Sci 98:5927-5932
- Meadows, J.R., Hanotte, O., Drögemüller, C., Calvo, J., Godfrey, R., Coltman, D., Maddox, J.F., Marzanov, N., Kantanen, J. & Kijas, J.W. 2006. Anim Gen 37:444-453.
- Meadows, J.R.S., Hawken, R.J. & Kijas, J.W. 2004. Anim Gen 35:379-385
- Naderi, S., Rezaei, H.R., Taberlet, P., Zundel, S., Rafat, S.A., Naghash, H.R., el-Barody, M.A., Ertugrul, O. & Pompanon, F. 2007. PLoS One 2(10):e1012.
- Naderi, S., Rezaei, H.R., Pompanon, F., Blum, M.G., Negrini, R., Naghash, H.R., Balkiz, O., Mashkour, M., Gaggiotti, O.E., Ajmone-Marsan, P., Vence, A., Vigne, J.D. & Taberlet P. 2008. Proc Natl Acad Sci 105:17659-64.
- Pidancier, N., Jordan, S., Luikart, G. & Taberlet, P. 2006. Mol Phylogenet Evol. 40:739-749.

Tabla 1. *Primers, regiones amplificadas y polimorfismos del cromosoma Y caprino.*

Primer	Cita ¹	Secuencia	Gen	Región primer	Mutación
AMELYF	A	ACTTACACCTCTGAAGTGGTAT	<i>AMELY</i>	Exón 4	Delección
AMELYR	A	CCATCCACCAACGGGTTTCATAG	<i>AMELY</i>	Exón 5	TATA
DBY1F	A	ACACTGGCACTTGAATGTTG	<i>DBY</i>	3' UTR	T>C
DBY1R	A	CCTTGGCATGTTATAGTTTC	<i>DBY</i>	3'UTR	
DBY2F	B	ATGGGAAACATTGARCTTAC	<i>DBY</i>	Exón 7	-
DBY2R	B	GGACCATCTGHATADATCTGAC	<i>DBY</i>	Exón 9	
UTYF	A	ACCGAGAAGCAAGACTAAGGAAG	<i>UTY</i>	5'UTR	-
UTYR	A	GCCATCTTCGTGAAGTTTCAG	<i>UTY</i>	Intrón 1	
ZFYF	A	CAGGAAATGGATGACAGTG	<i>ZFY</i>	Exón 5	C>T
ZFYR	A	AGCACTTGCAGTGCCACTCCGA	<i>ZFY</i>	Exón 6	

¹ A = Meadows et al. (2004), B = Goetting-Minesky et al. (2006)

Tabla 2. Descripción de los distintos haplotipos del cromosoma Y caprino

Haplotipo	Inserción <i>AMELY</i>	SNP <i>DBY</i>	SNP <i>ZFY</i>	Raza
H1	No	C	T	Saanen
H2	Sí	T	C	MAL, MG
H3	No	C	C	Tibetana

MAL: Malagueña, MG: Murciano-Granadina

Agradecimientos: El presente trabajo se ha financiado mediante los proyectos de conservación de recursos zoogenéticos RZ2007-00005-C02-01 y RZ2007-00005-C02-02 concedidos por el INIA.

IDENTIFICATION OF POLYMORPHISMS IN THE GOAT Y CHROMOSOME

ABSTRACT: Analysis of Y chromosome polymorphisms might provide valuable information about the vents that led to goat domestication and breed formation We have amplified and partially sequenced four loci of goat chromosome Y (*AMELY*, *DBY*, *UTY* y *ZFY*) in goats belonging to Murciano-Granadina, Malagueña, Saanen and Tibetan breeds. Polymorphisms were detected at intronic regions of genes *AMELY* (a tetranucleotide deletion), *DBY* (T>C) and *ZFY* (C>T). These polymorphisms are arranged in three haplotypes (H1, H2 and H3) matching the Y-chromosome haplotype diversity previously found in sheep European breeds (4 haplotypes). A next goal will be to sequence additional individuals and Y-chromosome regions to uncover the existence of additional y-chromosomal haplotypes in goats.

Keywords: goat, Y chromosome, genetic markers, domestication

DETECCIÓN DE INTROGRESIÓN DE GENES DE PERDIZ CHUKAR (*Alectoris chukar*) EN POBLACIONES SILVESTRES DE PERDIZ ROJA (*A. rufa*) DE LA PROVINCIA DE ÁLAVA

García, C.B., Bonafonte, J.I., Gálvez, A., Martínez-Sañudo, M.J., Graus, J. y Arruga, M.V. ¹
¹Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/Miguel Servet, 177. 50013. Zaragoza (Spain). mvarruga@unizar.es

INTRODUCCIÓN.

La escasez de perdiz roja (*Alectoris rufa*) en los campos, debida principalmente a causas como la progresiva destrucción de su hábitat natural o una elevada presión de sus predadores antrópicos y silvestres, hizo necesario el desarrollo de granjas cinegéticas para criar esta especie. La perdiz roja en pureza es una especie que no se adapta bien a la cría en cautividad. Algunos criadores de perdiz comenzaron a hibridar la perdiz roja con otra especie de perdiz del mismo género, perdiz chukar (*A. chukar*), que se adapta mejor a la cría en cautividad y tiene mejores índices productivos. Un ejemplar híbrido entre ambas especies además de ser más productivo (Nadal, 1992), es fértil y, tras retrocruzamientos sucesivos con perdiz roja, su aspecto fenotípico es prácticamente indistinguible del de una perdiz roja en pureza. La suelta en el campo y las repoblaciones con estos ejemplares híbridos tienen como resultado la introgresión de genes de perdiz chukar en la perdiz roja silvestre. Además, los cazadores reconocen que el comportamiento de estas perdices híbridas en el campo es distinto del de la perdiz roja, una de las razones por las que esta especie es tan apreciada en la caza menor. La legislación española, Ley 4/89 de Conservación de los espacios naturales y de la flora y fauna silvestre, así como la legislación europea, 79/409/EEC conocida como Directiva Aves, no permiten la introducción de especies foráneas que puedan contaminar el patrimonio genético de especies autóctonas, como es la perdiz roja.

Para la detección de ejemplares híbridos de perdiz roja y perdiz chukar se emplearon diferentes metodologías genéticas. Por una parte se analizó uno de los genes del DNA mitocondrial (Randi, 1996), y por otra se estudiaron diversos genes del DNA nuclear mediante el análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), metodología descrita por Williams *et al.* en 1990, y la búsqueda de polimorfismos de una única base nucleotídica (SNP), que es una metodología más apropiada para la diferenciación de especies que los microsatélites (Awise, 1994). La metodología RAPD ya ha sido empleada en estas especies para diferenciarlas e incluso para detectar sus híbridos (García y Arruga, 2005, Barbanera *et al.*, 2005), pero la identificación de híbridos mediante la caracterización de SNPs sólo ha sido desarrollada por el Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular de Zaragoza (García *et al.*, 2007). En las caracterizaciones de SNPs se emplea tanto el análisis por polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (Reilly y Thomas, 1980) como la discriminación alélica por PCR a tiempo real o RT-PCR (Johnson *et al.*, 2004). La complementariedad de los distintos marcadores genéticos permite una mayor potencia en la detección de ejemplares híbridos que la conseguida con cada una de las metodologías por separado. La aplicación de este tipo de análisis en el estudio de perdices silvestres de diferentes cotos de la provincia de Álava, permite estimar el estado genético de la perdiz roja en esta región. Con los resultados genéticos obtenidos en el muestreo se dispone de información necesaria para los planes de gestión de la especie.

MATERIAL Y MÉTODOS.

La Asociación de Cotos de Caza de Álava suministró las muestras de 54 perdices capturadas en 16 cotos de cuatro unidades de gestión para la caza menor de esa región (figura 1). Las muestras consistieron principalmente en plumas. Para el contraste de los resultados se emplearon 42 muestras de perdiz roja, procedentes de museos y colecciones privadas, 315 muestras de perdiz chukar de diferentes orígenes (Chipre, Grecia, Argentina y España) e híbridos F1 (*A. rufa* x *A. chukar*).

En la extracción de DNA se empleó el kit DNeasy Tissue (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El procedimiento de análisis de las muestras de perdiz consistió en la aplicación de las diferentes metodologías recogidas en la patente EP 1 865 069 A1, junto con otras que están en proceso de ser patentadas. El conjunto de metodologías abarca el análisis de DNA mitocondrial, varios RAPDs y la caracterización de diversos SNPs. El análisis de DNA mitocondrial consiste en la amplificación del fragmento de un gen mitocondrial y su posterior digestión con una enzima de restricción, tratándose por tanto de un RFLP. La enzima de restricción únicamente encuentra su secuencia específica de restricción en perdices chukar e híbridos de perdiz roja con chukar y se visualizan los resultados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los análisis tipo RAPD consisten en la amplificación de fragmentos al azar con cebadores de poca longitud y en unas condiciones inespecíficas de amplificación. La optimización con esta metodología permite que en la visualización de los productos de PCR, en geles de agarosa, se observen diferentes patrones de bandas, estables para las especies de perdiz y que contienen alguna banda diagnóstica diferente entre las especies. Los SNPs se analizaron con dos metodologías: amplificación de los genes y digestión con enzimas de restricción (RFLP) o discriminación alélica con sondas marcadas con fluorocromos diferentes para las secuencias de las dos especies (RT-PCR). La visualización de resultados de RT-PCR se hace directamente en la pantalla del ordenador conectado al termociclador a tiempo real sin necesidad de posterior manipulación de los productos de PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las diferentes metodologías demostraron ser efectivas en la detección de híbridos. Todas ellas identificaron las muestras control F1 como híbridos. También se obtuvieron patrones consistentes y estables en las muestras de perdiz roja y de perdiz chukar. La metodología RT-PCR es muy rápida ya que se obtienen los resultados a tiempo real cuando se desarrolla la amplificación y no se necesita ninguna manipulación posterior de los productos de PCR. Tanto la metodología RAPD como RFLP requieren una visualización de sus resultados de amplificación en geles de agarosa, además en el análisis con RFLPs se tiene que realizar un paso adicional de digestión con enzimas de restricción y son por lo tanto unas metodologías en las que se tarda más tiempo en obtener los resultados finales.

Los ejemplares muestreados en la provincia de Álava se consideraron híbridos cuando se detectaron como tales en cualquiera de las metodologías, incluso cuando la detección fue sólo con una de ellas.

Se identificaron perdices híbridas en tres de las cuatro unidades de gestión de caza menor de la provincia de Álava (tabla 1). Se debe tener en cuenta que en la unidad de gestión en la que no se detectó ningún híbrido, fue aquella en la que un menor número de cotos se muestrearon y menos ejemplares se analizaron. Los porcentajes de hibridación en las otras tres unidades de gestión fueron variables oscilando de 5,9% a 30%. Se obtuvo una media de 16,67% de hibridación para el total de muestras de la región de Álava, aunque las grandes diferencias observadas en las muestras, dependiendo de su origen, sugieren tomar este dato con cautela.

Se estima conveniente el análisis genético de los reproductores de las granjas cinegéticas que suministran las perdices para ser soltadas o repoblar las áreas cinegéticas de la provincia de Álava. Adicionalmente, también convendría hacer controles genéticos periódicos de las perdices a soltar en el campo, mediante muestreos, para comprobar el correcto funcionamiento de todas las partes implicadas en el proceso de producción y análisis de las perdices criadas en cautividad. Con estas medidas de gestión se puede reducir paulatinamente la hibridación de la perdiz roja en los campos alaveses, así como en el resto de regiones, asegurando el cumplimiento de la legislación vigente y colaborando en el mantenimiento de esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Avise, J. C. 1994. Chapman & Hall, New York.
- Barbanera, F., Negro, J. J., Di Giuseppe, G., Bertocini, F., Capelli, F. & Dini, F. 2005. *Biol Conserv* 122: 275–287.
- García, C. B. & Arruga, M. V. 2005. *Avian Poult. Biol. Rev.* 16(2): 81-86.
- García, C. B., Monteagudo, L. V.,

Tejedor, M. T., Angulo, B., Gruas, C., Gómez, M. J., Marín F. & Arruga, M. V. 2007. ITEA extra 28 (II): 429–431. • Johnson, V. J., Yucesoy, B. & Luster, M. I. 2004. Cytokine 27: 135-141. • Nadal, J. 1992. Fundación La Caixa, Barcelona: 87–100. • Randi, E. 1996. Mol. Phylogenet. Evol. 6: 214–227. • Reilly, J. G. & Thomas, C. A. Jr. 1980. Plasmid 3(2):109-115. • Williams, J. G. W., Kubelik, A. R., Livak, K. F., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. Nucleic Acids Res. 18: 6531- 6535.

Tabla 1. Resultados de hibridación de perdiz roja con perdiz chukar en las diferentes unidades de gestión de caza menor de la provincia de Álava.

Unidades de gestión para la caza menor	Nº cotos muestreados	Nº ejemplares perdiz muestreados	Nº híbridos	% hibridación
Valles Norte	2	20	6	30
Valles Sur	6	17	1	5,9
Rioja Alavesa	7	14	2	14,29
Llanada Occidental	1	3	0	0

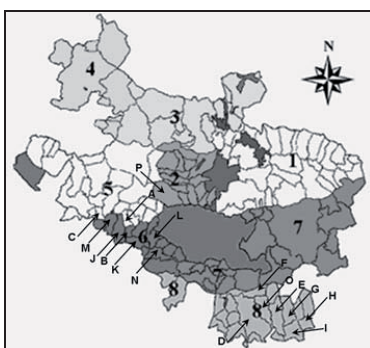


Figura 1. Mapa de la provincial de Álava con localización por flechas de los puntos de recogida de las muestras de perdiz. Las distintas unidades de gestión para la caza menor son representadas por números y los cotos analizados con letras (de A a P).

Agradecimientos: Los autores desean agradecer a la Asociación de Cotos de Caza de Álava su colaboración en la recogida de muestras. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA-CICYT (RZ2004-00011-00-00).

DETECTION OF INTROGRESSION OF CHUKAR PARTRIDGE (*ALECTORIS CHUKAR*) GENES INTO THE RED-LEGGED PARTRIDGE (*A. RUFA*) IN THE WILD IN ÁLAVA REGION (SPAIN)

ABSTRACT. The genetic status of the red-legged partridge (*A. rufa*) has been checked in the Alava region of Spain (North). Detection of hybridisation of this species with chukar partridge (*A. chukar*) has been developed by the use of different genetic methods: analysis of mitochondrial DNA, use of random amplified polymorphic DNA (RAPDs) and analysis of nuclear single nucleotide polymorphisms (SNPs). Some hybrid individuals have been identified among the wild birds by the different procedures. The hybrids were distributed in different hunting areas.

Keywords: hybridisation, SNPs, RADPs, mit-DNA

DETECCIÓN CUELLOS DE BOTELLA EN LA GALLINA VALENCIANA DE CHULLILLA

Grimal, A., Gómez, E.A. y Viudes de Castro, M.P.

Centro de Tecnología Animal (CITA). Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Apartado 187. 12400 Segorbe. Castellón.

e-mail: grimal_amp@gva.es

INTRODUCCIÓN

Hemos de evitar que se produzcan cuellos de botella (reducciones drásticas en el censo efectivo de la población (N_e)) en especies amenazadas puesto que conllevaran aumentos de las tasas de consanguinidad, pérdidas de variabilidad genética y mayor probabilidad de fijación de alelos deletéreos, reduciendo, por tanto, el potencial adaptativo e incrementando la probabilidad de extinción (Cournet y Luikart, 1996). Existen varios modelos para detectar cuellos de botella, partiendo de datos de secuenciación de ADN. Estos dependen del proceso de mutación asumido para los diferentes loci. Clásicamente, se describen dos modelos de mutación, el IAM (Infinite Allele Model) en el que cada mutación genera un nuevo alelo no existente y el SMM (Stepwise Mutation Model) en el que el proceso de mutación consistiría en ganar o perder una unidad de repetición. Los microsatélites mutan de una manera intermedia entre estos modelos, por lo que se definió un tercero, TPM (Two-Phase Mutation model), que asume que la mayoría de las mutaciones conllevan la ganancia o pérdida de una unidad de repetición pero que también se producen mutaciones de mayor tamaño (Di Rienzo et al., 1994). El presente estudio, partiendo de una caracterización molecular basada en microsatélites, intenta detectar posibles cuellos de botella en la historia reciente de la Gallina Valenciana de Chulilla mediante cinco pruebas estadísticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se genotipó la población base de la Gallina Valenciana de Chulilla (77 animales) para 20 microsatélites (ADL268, MCW216, MCW248, LEI094, MCW295, MCW081, MCW069, MCW034, MCW111, LEI234, LEI166, MCW078, MCW067, MCW330, MCW098, ADL278, MCW016, MCW014, MCW183, MCW123, MCW165). Los datos obtenidos se analizaron con BOTTLENECK 1.2.02. que lleva a cabo cuatro pruebas para detectar severas reducciones recientes del tamaño efectivo de población, N_e , entendiendo como recientes las ocurridas en las últimas $2N_e-4N_e$ generaciones (Piry et al., 1999).

Un primer test es el *Sing Test* o prueba de exceso de heterocigosidad (Cournet y Luikart, 1996). Para loci selectivamente neutros, como son los microsatélites, la distribución del número de alelos y sus frecuencias en poblaciones naturales resulta de un equilibrio entre mutación y deriva, siendo los parámetros de este equilibrio la tasa de mutación (μ) y el N_e . Cuando ocurre una reducción drástica en el N_e de una población, se produce una disminución progresiva del número de alelos y de la heterocigosidad (H_e). Sin embargo, la diversidad alélica se reduce más rápidamente que H_e ya que se suelen perder primero los alelos raros, que contribuyen poco a la H_e , y como consecuencia hay un exceso de H_e con respecto a la heterocigosidad esperada en una población en equilibrio mutación-deriva según el número de alelos encontrados (H_{eq}). Este exceso de H_e persiste durante un cierto número de generaciones hasta que se establece un nuevo equilibrio mutación deriva. Este test determina si la proporción de loci con exceso de H_e es significativamente mayor que la esperada en equilibrio mutación deriva (H_{eq}). El segundo test, *Standardized Differences Test*, establece si la media de las diferencias estandarizadas entre la heterocigosidad esperada y observada es significativamente distinta de cero, asumiendo un estadístico que se distribuye como una normal estandarizada ($N(0,1)$). La tercera de las pruebas, *Wilcoxon's signed Rank test*, utiliza un procedimiento no paramétrico, semejante una T de Student para muestras apareadas. Finalmente, la cuarta prueba fue desarrollada por Luikart et al. (1998) y se trata de un *método gráfico* que consiste en agrupar los alelos en 10 clases de frecuencias alélicas (0,001-0,1, ..., 0,901-1) y representar el histograma de frecuencias. En poblaciones que no han sufrido un cuello de botella, aparecen una gran proporción de alelos en frecuencias bajas (0,001-0,1), dando un histograma denominado *L-shaped*, sin embargo aquellas poblaciones que habían sufrido una reducción en su N_e , mostraron menos alelos en

frecuencias bajas ($<0,1$) que en una o más frecuencias intermedias (0,001-0,9), debido a la pérdida de alelos raros, produciendo una forma denominada *mode-shifted* o distorsión en la distribución de frecuencias alélicas. Aunque BOTTLENECK 1.2.02. permite realizar los cálculos según los tres modelos de mutación, sólo se ejecutó la opción con el modelo de mutación en dos fases, TPM, siendo los parámetros utilizados una varianza igual a 10, una proporción de mutaciones simples del 90% y un número de iteraciones igual a 10.000.

La última prueba, *M-ratio test* presentada por Garza y Williamson (2001), detecta la presencia de cuellos de botella a partir del ratio entre el número de alelos y el rango de tamaño de los mismos según el estadístico $M = k/r$, donde k es el número de alelos y $r = S_{max} - S_{min} + 1$ (siendo S el tamaño de los alelos), lo que permite interpretar M como el porcentaje medio de estados alélicos que están ocupados. Cuando una población sufre una reducción drástica de N_e , generalmente se pierden alelos, reduciendo el valor de k . El valor de r sólo se reduce si el alelo que se pierde es el de mayor o menor tamaño. Por tanto k disminuye más rápidamente que r dando un valor de M menor en poblaciones que han sufrido una reducción en tamaño que en poblaciones que se encuentran en equilibrio. Se propone la existencia de un valor crítico, M_c , por debajo del cual se asume que una población ha sufrido un cuello de botella, siendo este M_c elegido de manera que el 95% de las simulaciones de una población en equilibrio tienen $M > M_c$. El valor, por defecto, es de 0,68 para más de 7 loci. Este modelo depende de tres parámetros: $\theta = 4N_e\mu$ (siendo N_e el tamaño efectivo de población antes del cuello de botella, y μ la tasa de mutación = 5×10^{-4}), p_s , o la proporción de mutaciones simples, y Δ_g , o tamaño medio de las mutaciones no simples. Tras comparar simulaciones y datos reales, concluyeron que la parametrización más razonable era $p_s = 90\%$ y $\Delta_g = 3,5$. Se calculó el estadístico M con *M_P_VAL.EXE*, mientras que para calcular el M_c se empleó *CRITICAL_M.EXE* con la parametrización recomendada y con valores de N_e de 500, 1000 y 5000 que corresponden a $\theta = 1, 2$ y 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La representación gráfica de las frecuencias alélicas (Figura 1) muestra una distribución *L-shaped*, lo que indicaría que la población se encuentra en equilibrio mutación-deriva, ya que hay una mayor proporción en frecuencias alélicas bajas (0,284 para el rango 0,001-0,1) que para frecuencias alélicas intermedias. Este resultado concuerda con los obtenidos con el resto de pruebas (Tabla 1). Sin embargo, el *M-ratio test*, aunque la población tiene un valor de M de 0,704, por encima del valor $M_c = 0,68$, no supera a ninguno de los tres valores críticos calculados para las tres situaciones supuestas, por lo que, según este enfoque, la población sí habría pasado por un cuello de botella.

En un reciente estudio de simulación para comparar diferentes métodos para la detección cuellos de botella (Williamson-Natesan, 2005) indicaban que, al utilizarse diferentes estadísticos, se consideran escalas de tiempo diferentes para detectar estas reducciones del N_e . El modelo que mostró la menor potencia fue el "método gráfico". El *M-ratio test*, mostró ser mejor cuando el cuello de botella había durado varias generaciones y posteriormente la población había tenido una recuperación demográfica y cuando el N_e antes del cuello de botella era grande. Sin embargo, los otros tres test eran mejores si el cuello de botella era menos severo, o era muy reciente o la N_e antes de su reducción era pequeña. Además, el *M-ratio* puede estar sesgado a la baja si se han introducido nuevos alelos de poblaciones vecinas (Garza y Williamson, 2001).

Hay evidencias de animales de plumaje giro de características similares a nuestra población, descritos a principios del siglo XX (1920), estando enmarcados dentro de las razas nacionales sin arquetipo (Grimal y Gómez, 2007). Dado el sistema de cría en corral que han tenido estos animales, sin control oficial hasta hace pocos años, no sería nada extraña la presencia de genes de otras poblaciones, lo que disminuiría el valor del estadístico M . Por tanto, de acuerdo a los resultados preliminares aquí indicados, se puede concluir que la población de Gallina Valenciana de Chulilla no ha sufrido un descenso reciente en el tamaño efectivo de población. Si bien, el valor del *M-ratio*, puede referirse a algún cuello de botella en el pasado (principios de Siglo XX), seguido de una reciente recuperación en el censo

poblacional. Se precisa continuar estudiando esta posibilidad, aumentando el número de marcadores y el número de muestras de animales de otros orígenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Cournet, J.M. & Luikart, G. 1996. *Genet.* 144:2001-2014. ● Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. & Freimer, N.B. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3166-3170. ● Garza, J.C. & Williamson, E.G. 2001. *Mol. Ecol.*, 10: 305-318. ● Grimal, A. & Gómez, E. 2007. *Arch. Zootec.* 56: 523-528. ● Luikart, G., Allendorf, F.W., Cournet, J.M. & Sherwin, W.B. 1998. *J. Hered.* 89:238-247. ● Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.M. 1999. *J. Hered.* 90: 502-503. ● Williamson-Natesan, E. 2005. *Conserv. Genet.* 175: 219-233.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado con fondos FEDER-INIA para proyectos de conservación de recursos zoogenéticos (RZ2004-040 y RZ2008-279).

BOTTLENECK DETECTION IN CHULLILLA VALENCIAN BREED

ABSTRACT: Several tests for detecting recent population bottleneck were applied to the Chulilla Valencian breed using allele frequency data, with a battery of 20 microsatellites. Sing test (or heterozygosity excess when compared with a population in equilibrium), Standardized differences test (differences between observed and expected heterozygosity in the equilibrium) and Signed rank test were not significant. Observed distribution of microsatellites frequencies was L-shaped, indicating mutation drift equilibrium, with a larger proportion of low frequencies. In recently reduced populations, M-ratio value is smaller than critical. Estimated M-ratio was 0.704, lower than critical values, but this ratio could be biased when new alleles were introduced coming from neighbourhood. Most sensible analyses must be done considering the prolonged small population size of Chulilla Valencian breed.

Keywords: *bottleneck, genetic resources, genetic diversity, microsatellite, Chulilla breed*

Tabla 1. Test para la detección de reducciones recientes en el tamaño efectivo de población. (N_e de 500, 1000 y 5000 se corresponden con $\theta = 1, 2$ y 10)

Bottleneck Tests		M-ratio Test	
Sing test	Exp = 11,30	M	0,704
	Obs = 12	Mc ($\theta = 1$)	0,814
Standardized differences test	Prob. = 0,475	Mc ($\theta = 2$)	0,785
	T2 = 1,099	Mc ($\theta = 10$)	0,747
Wilcoxon's signed rank test	Prob. = 0,136		
	Prob. = 0,108		

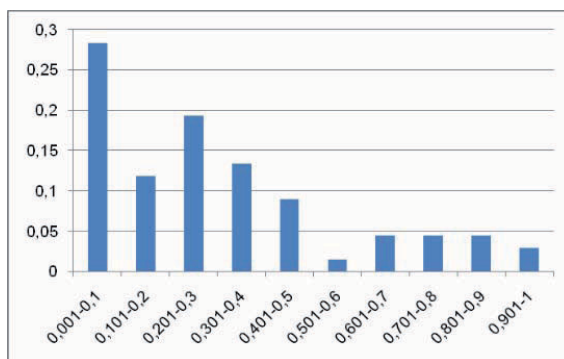


Figura 1. Distribución de las frecuencias alélicas de los 20 microsatélites.

VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA LONGITUDINAL EN UNA REGIÓN CANDIDATA PARA QTL DEL CROMOSOMA 4 PORCINO

Ojeda, A.¹, Ramos, S.^{1,2}, Marletta, D.³, Folch, J.M.¹ y Pérez-Enciso, M.^{1,4}

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.

²Centre de recerca en agrogenòmica, 08193 Bellaterra

³D.A.C.P.A, Sez. di Scienze delle Produzioni Animal, 95123 Catania, Italia

⁴Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, C/ Lluis Companys 23, 08010, Barcelona.

E-mail: ana.ojeda@uab.es

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de animales domésticos nos permiten identificar la huella de la selección y de la domesticación mediante el estudio de la variabilidad genética a lo largo del genoma. Las regiones que contienen genes candidatos poseen un interés adicional por sus implicaciones socio económicas. El locus FAT1 del cromosoma 4 porcino es, sin duda, una de las regiones más interesantes debido a su importante efecto en el depósito de grasa dorsal y crecimiento. Previamente, hemos estudiado los genes *FABP4* (Ojeda *et al.*, 2006) y *FABP5* (Ojeda *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos para ambos fueron muy diferentes, a pesar de su proximidad física (~ 180 kb) y funcional. El nivel de polimorfismo detectado para el gen *FABP4* fue seis veces superior al del gen *FABP5*: $\pi = 1,2\%$ vs. $0,19\%$, respectivamente. Además, ambos genes presentaron una estructura haplotípica diferente, la raza más polimórfica para el gen *FABP4* (Ibérico) fue la menos variable para el *FABP5*, mientras que en Duroc observamos lo contrario. El objetivo del presente trabajo fue ampliar el estudio a una región de unas 2 Mb centrada en estos dos genes, en la que secuenciamos 13 regiones de unas 500 pb no codificantes espaciadas uniformemente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Se han secuenciado 32 cerdos que incluyen poblaciones asiáticas (razas Vietnamita, Fengjing, Minzhu, Meishan, Licha Black and Luchuan) y europeas (Ibéricos de la estirpe Retinto y Guadyrbas, Duroc, Large White, Landrace, Hampshire, Berkshire, Pietrain, raza sintética española y Siciliana). De las razas Ibérico (IB), Duroc (DU), Siciliana (SI) y Landrace (LR) se secuenciaron cinco individuos por raza excepto para LR, que se secuenciaron cuatro. Para el resto de poblaciones se secuenció un único individuo. Como *outgroup* se ha utilizado un Babirusa (*Babirusa babirusa*) del zoo de Madrid.

Identificación de polimorfismos

A partir de la secuencia pública del BAC porcino del cromosoma 4 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/) se localizaron las posiciones de los genes *FABP4* y *FABP5*, así como la de otros genes en una región de 2 Mb centrada en los FABPs. Se identificaron tres genes más, ZBTB, IMPA1 y ZNF. Además, se seleccionaron ocho regiones no anotadas. En total, se amplificaron y secuenciaron 13 regiones de aproximadamente 500 pb (que en el caso de los genes corresponden al intrón 1) separadas entre ellas unos 100-200 kb. Las condiciones de las PCR fueron 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 500 nM de cada cebador, 50 ng ADN genómico y 0.6 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystem) en un volumen final de 25 μ l. El perfil térmico consistía en 95 °C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C 0,5 min, 63 °C 1 min y 72 °C 1,5 min, y una extensión final de 72 °C durante 15min. Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados mediante *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* en un secuenciador ABI PRISM 3730 (*Applied Biosystems*). El análisis de las secuencias e identificación de polimorfismos se realizó mediante el programa *SeqScape v2.5 (Applied Biosystems)*.

Análisis estadístico y genético

A partir de las secuencias se reconstruyeron las fases mediante el programa *Phase v2.1.1* (Li and Stephens 2003) usando las opciones por defecto, excepto que el programa corrió 5

veces y la última interacción fue 10 veces más larga, tal y como sugieren los autores. El índice de diversidad nucleotídica (π) y otros estadísticos fueron estimados con DnaSP v4.10 (Rozas *et al.* 2003). Además, se ha estudiado también la estructura poblacional mediante el programa Structure (Pritchard JK *et al.* 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han identificado un total de 177 posiciones polimórficas, que incluyen 12 *singletons*. A efectos de los análisis, se hicieron seis grupos: las cuatro poblaciones europeas con más de dos animales secuenciados (DU, IB, LR, SI), los animales asiáticos (ASI) y un último grupo europeo (EUR1) donde se incluyeron los individuos únicos por raza con origen europeo y un individuo de cada población DU, IB, LR y SI, en este último grupo sólo hemos incluido un haplotipo de cada animal.

La Figura 1. muestra un esquema de la región secuenciada y la variabilidad encontrada para cada una de las poblaciones (π). Globalmente, la variabilidad fue mucho mayor en Asia, sobre todo en algunas regiones (1 y 9). Sin embargo, es interesante constatar que la región del FABP4 (región 6) fue mucho más variable en Ibérico o Duroc que en Landrace o Large White, razas mucho más magras.

Mediante *Structure* (Figura2), se ha observado que cuando $k = 4$ (el número óptimo de clusters), se forma un cluster (verde) que contiene individuos de todas las poblaciones pero sobre todo de la Siciliana, Landrace y Duroc, mientras que Duroc y, curiosamente, Ibérico, parecen las más 'mezcladas'. La población asiática presenta tres de los cuatro posibles clusters.

En resumen, podemos concluir que la variabilidad observada en el gen *FABP4* efectivamente es superior a la del gen *FABP5* y no presenta un patrón específico respecto a las razas más seleccionadas, en el presente trabajo LR es de las menos variables junto con SI, que es una raza más local. Respecto a la variabilidad de toda la región, se observa que las razas asiáticas son más polimórficas. Al estudiar la estructura poblacional se observa una cierta heterogeneidad dentro de las poblaciones excepto en el caso de LR y SI que pertenecen al mismo cluster y tienen poca presencia de otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Li, N. & M. Stephens. 2003. *Genetics* 165, 2213-33.
- Ojeda *et al.* 2006. *Genetics* 174(4), 2119-27
- Ojeda *et al.* 2008. *Animal Genetics* 39(5):468-73.
- Pritchard JK *et al.* *Genetics* 155: 945-959.
- Rozas *et al.* 2003. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.

Agradecimientos: Agradecemos a las diversas personas e instituciones que nos han cedido muestras para este estudio. Trabajo financiado por los proyectos AGL2007-65563-C02-01/GAN del MEC. Ana Ojeda disfruta de una beca FPI del MEC.

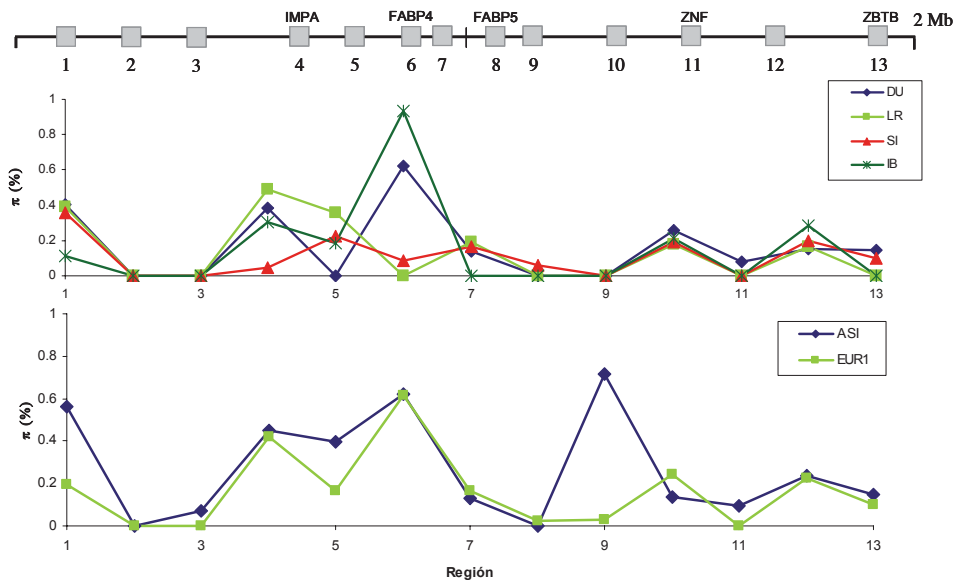


Figura 1. Esquema de la región secuenciada y variabilidad en cada una de las poblaciones.

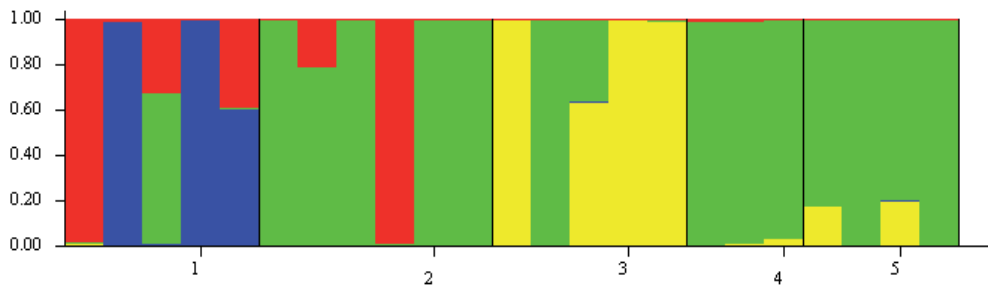


Figura 2. Estructura de cinco poblaciones: 1, Animales asiáticos; 2, Duroc; 3, Ibérico; 4, Siciliana; 5, Landrace. Las líneas negras verticales separan cada una de las poblaciones.

NUCLEOTIDE VARIABILITY ALONG A REGION CONTAINING A STRONG QUANTITATIVE TRAIT LOCUS EFFECT IN THE PIG

ABSTRACT: Domestic animal species offer extremely valuable resources to understand the effects of strong directional selection in structured populations. Porcine chromosome 4 (SSC4) harbors a quantitative trait locus (QTL) with an important effect in fatness and growth but whose ultimate causative mutation - or mutations - are yet unknown. Previous studies from our group support that the fatty acid binding protein (FABP) cluster are relevant positional candidate genes. In a previous work, we studied *FABP4* and *FABP5* genes and we showed that *FABP4* had nucleotide variability indices six-fold higher than *FABP5*. Besides, haplotype structures of *FABP5* and *FABP4* were dramatically different, and the Hudson-Kreitman-Aguadé test was highly significant. Here we report a longitudinal analysis of nucleotide variability along a region of ~ 2 Mb in SSC4 that includes the complete *FABP4* and *FABP5* gene together with ~ 550 bp segments in genes *IMPA1*, *ZNF*, *ZBTB10* and eight non coding regions.

Keywords: Quantitative trait locus *FAT1*, fatty acid binding protein, nucleotide diversity.

COMPARACIÓN DE CUATRO KITS COMERCIALES DE EXTRACCIÓN DE ARN BACTERIANO A PARTIR DE MUESTRAS DE LECHE

Secchi, S.², Serrano, A.¹, García-Nogales, P.², Gutiérrez, S.³ y Arís, A.¹

¹ Unidad de Rumiantes, IRTA-Torre Marimón, Caldes de Montbuí, España. ² AROMICS, Parque Científico, Barcelona, España ³ CRIC; Travessera de Gracia, Barcelona, España. anna.aris@irta.es

INTRODUCCIÓN

Una identificación rápida de microorganismos en leche puede permitir un control de calidad de los productos, posibilitar un diagnóstico temprano de enfermedades, así como evitar la extensión incontrolada de contaminaciones indeseadas. La detección de bacterias en leche, por lo tanto, ha de ser una técnica idealmente sensible, específica y con capacidad de analizar gran cantidad de muestras en el menor tiempo posible, requerimientos todos asociados a técnicas de diagnóstico molecular.

El desarrollo de métodos de identificación bacteriana basados en la extracción de ácidos nucleicos e identificación de secuencias diana de ADN o ARN, incrementa la especificidad y sensibilidad del diagnóstico en un tiempo reducido (Mothershed y Whitney, 2006). La elección del tipo de ácido nucleico diana influencia la complejidad del tratamiento de la muestra. Las moléculas de ARN son menos estables que el ADN debido a que son más sensibles a hidrólisis. Sin embargo, el ARN representa el estado metabólico celular (i.e. identificación de contaminantes activos en la leche) y el número de moléculas puede variar, una característica importante cuando hay una baja concentración bacteriana y no se desea realizar un pre-tratamiento de enriquecimiento de la muestra.

Actualmente los procedimientos comerciales de extracción y aislamiento de moléculas de ARN se basan en dos métodos: una extracción por adsorción en fase sólida de sílica o una extracción mediante agentes caotrópicos (guanidina-tiocianato) y separación en fase acuosa mediante saturación con fenol-cloroformo.

En este estudio se comparan cuatro métodos comerciales de extracción de ARN a partir de muestras bacterianas obtenidas de un en medio de cultivo con o sin leche. Dos de los métodos están basados en la extracción tipo sílica: RNeasy Protect Bacteria kit (Qiagen) y el NucliSENS miniMAG (Biomerieux) y los métodos TRIzol (Invitrogen) y RiboPURE Bacteria kit (Ambion) basados en una extracción guanidina fenol-cloroformo. Se compara la eficiencia de cada kit en términos de rendimiento y pureza del ARN obtenido a partir de dos especies bacterianas, una Gram negativa, *Escherichia coli*, y una Gram positiva, *Staphylococcus aureus*. Asimismo, se describe la velocidad y otras características a tener en cuenta a la hora de escoger el método más adecuado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron las cepas comerciales de *Escherichia coli* CGSC 5073 y *Staphylococcus aureus* CECT240 y los medios de cultivo Luria Bertrani (LB) y Nutrient Broth(NB) para su crecimiento, respectivamente. Se realizaron pre-inóculos de 5ml y cultivos de 30ml, a 37°C y 200rpm. El crecimiento se siguió mediante densidad óptica a 550nm (DO₅₅₀) hasta alcanzar una DO₅₅₀=0,5. Este valor se utilizó como referencia para la extracción de ARN. El número de células correspondiente a una DO₅₅₀=0,5 se verificó mediante recuento de células viables. Se realizaron diluciones seriadas en NaCl 0,9% de 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ por duplicado y se sembraron 100µl de cada una por duplicado en placas de agar de los respectivos medios. El recuento se expresó como unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) descartándose aquellas placas con un número de colonias superior a 300 o inferior a 15.

Para la extracción de ARN, muestras de 1ml de cultivo (DO₅₅₀=0,5) se centrifugaron por triplicado a 6000xg a temperatura ambiente (TA). Se descartó el sobrenadante y los pellets se guardaron a -20°C hasta su utilización. Para la extracción con leche UHT, los pellets celulares se resuspendieron primero en 1ml de leche UHT entera a 37°C y se centrifugaron en las mismas condiciones mencionadas.

La extracción de ARN se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante en todos los kits. En el caso de los kits NucliSENS MinMAG (Biomerieux) y TRIzol Max Bacterial (Invitrogen) se introdujo un paso de disrupción celular mediante bead-beater. Este paso común consistió en la resuspensión del pellet celular en 300µl de agua RNasa-free y 2ml de reactivo NucliSENS lysis buffer o TRIzol. La suspensión se mezcló con bolas de vidrio de 0,1mm, en un rango de 26-36 mg por ml de muestra a tratar. Se realizaron dos ciclos de disrupción de 2 min 30seg, con un minuto en hielo entre ciclos. Las muestras se centrifugaron a 16000xg durante 1 minuto a TA. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se prosiguió según instrucciones del fabricante.

El ARN fue cuantificado mediante densidad óptica a 260nm (DO₂₆₀). La pureza e integridad se analizó mediante Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad) utilizando Experion HighSens chips.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comparar los diferentes kits de extracción de ARN se fijó la cantidad de células a partir de la cual realizar cada extracción. Para ello, se escogió como referencia el punto de crecimiento exponencial de *E. coli* de DO₅₅₀= 0.5 y se verificó el mismo comportamiento para *S. aureus*. Se determinó la cantidad de células viables en este punto para ambas cepas obteniéndose una correspondencia final de 1,4x10⁸ and 2,8x10⁸ cfu/ml para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Para evitar variabilidad en los cultivos, se realizó un único crecimiento de cada cepa a partir del cual se recogieron muestras de 1ml a DO₅₅₀= 0.5 por triplicado para realizar la extracción de ARN con cada kit. La Figura 1 resume la cantidad total de ARN obtenido con cada kit para cada cepa en presencia o no de leche UHT. Se observó que el kit de Qiagen reportó los mejores valores de rendimiento de obtención de ARN con *E. coli* y estuvo entre los mejores para *S. aureus*. El rendimiento de recuperación fue mayor para *E. coli* que para *S. aureus* partiendo, sin embargo, de la misma cantidad de células. Este hecho podría estar asociado a que generalmente estos kits comerciales están desarrollados y optimizados utilizando una cepa bacteriana en particular, muy probablemente *E. coli*. Igualmente, a pesar de haber introducido un paso común de disrupción celular mecánica, la diferente composición de pared entre ambas cepas, junto con la diferente morfología celular, podría explicar una peor disrupción del coco Gram positivo *S. aureus* (Geciova et al., 2002). Por otro lado, con el kit de Ambion se obtuvo la menor cantidad de ARN en ambas especies bacterianas. Hay que destacar que el análisis de la varianza por ANOVA indicó que no se encontraron diferencias significativas entre las extracciones realizadas a partir de medio de cultivo o en presencia de leche con ningún kit ni en ninguna de las dos cepas.

Posteriormente, se determinó la integridad de las moléculas de ARN obtenidas mediante el sistema de electroforesis automatizada Experion de Bio-Rad. Básicamente, una mayor calidad de ARN está relacionada con una ausencia de contaminantes u otros picos que no sean los correspondientes al 16SrARN o el 23SARN. El análisis de las muestras indicó una mayor integridad del ARN en las muestras obtenidas con el kit de Qiagen. Con otros kits, se observó presencia de contaminantes excepto con el kit de Ambion con el que no se observaron picos debido a la poca cantidad de ARN extraído.

Por último, los requerimientos de material y equipo necesarios para la utilización del kit de Qiagen están entre los más limitados (en comparación con los otros kits), lo cual también es un importante punto a destacar. Este kit permite la extracción de unas 6 muestras a la hora, no utiliza compuestos nocivos y no presenta puntos críticos en su desarrollo, es fácil de transportar y potencialmente automatizable. Debido a sus características y a los resultados obtenidos, tanto a nivel de calidad como de cantidad de ARN para ambas cepas bacterianas, concluimos que Qiagen es el mejor kit comercial de los cuatro mencionados en este estudio para la extracción en presencia de leche de moléculas íntegras de ARN bacteriológico bajo las condiciones aquí descritas.

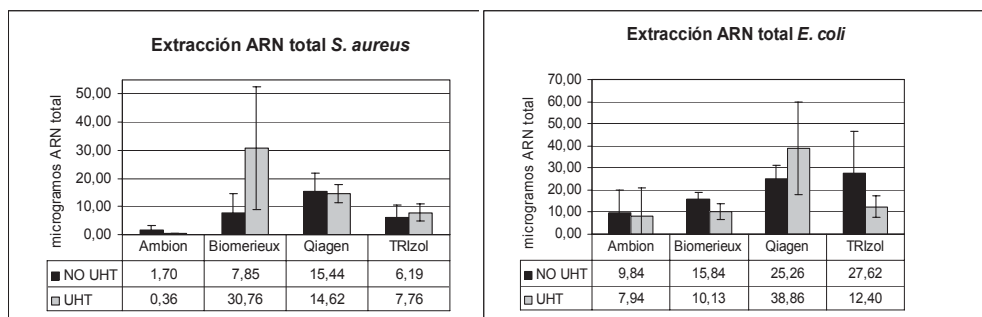


Figura 1. Cantidad total de ARN (μg) obtenidos con cada kit para cada microorganismo, en presencia (UHT) o ausencia (NO UHT) de leche.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mothershed, E.A. & Whitney, A.M. 2006. Clin. Chim. Acta 363(1-2):206-20.
- Geciova, J., Bury, D. & Jelen P. 2002. Inter. Dairy J. 12: 541-553

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la EU-FP6: a través del proyecto Pathomilk. "Pathomilk is the acronym for an EU-funded Framework VI project to create a rapid and cost effective tool for multi-pathogen detection in milk. The Pathomilk consortium consists of 22 partners comprising research establishments, SME's, farming associations and practical milk producers."

COMPARISON OF FOUR COMMERCIALY AVAILABLE RNA EXTRACTION METHODS FOR EFFECTIVE RNA ISOLATION FROM MILK

ABSTRACT: Detection of target microorganisms in milk or dairy products is of significant importance in terms of revealing contaminations, possible early disease diagnostics, quality control of milk, as well as prevention of further spread of undesirable microorganisms through the herd, farm or dairy industry.

Nucleic-acid based bacterial identification methods are extremely useful due to their specificity and sensitivity and usually they are related to molecular high-throughput techniques. However, they require an optimal purified sample preparation specially when applied to milk or food products.

In this study we describe the comparison among four commercially available RNA extraction kits for the purification of bacterial RNA isolated from milk samples. Two kits are based in silica-based extraction, the RNeasy protect bacteria kit (Qiagen) and the NucliSENS miniMAG (Biomerieux), and the other two in the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Trizol (Invitrogen) and RiboPure-bacteria kit (Ambion). We compared their efficiency and purity in RNA extraction and recovery from two bacterial species, a Gram negative *Escherichia coli* and a Gram positive *Staphylococcus aureus*, in culture broth or in UHT milk. We also describe their speed and other features to take into account. We conclude that Qiagen is the most suited kit under the experimental conditions of this study.

Keywords: RNA, extraction, milk, bacterial

TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL ENTRE MACHOS Y HEMBRAS DE GENES PORCINOS RELACIONADOS CON LA ELIMINACIÓN DE ESCATOL Y ANDROSTENONA EN HÍGADO

Fernández, A.I., Fernández, A., Pérez-Montarelo D., Fernández-Rodríguez A., Barragán C., Nieto M., Rodríguez M.C., Toro M.A., Silió L. y Óvilo C.

Dpto. Mejora Genética Animal. INIA. Ctra. Coruña Km7.5. 28040 Madrid. avila@inia.es

INTRODUCCIÓN

La producción y comercialización de cerdos enteros en los países de la UE está afectada por el riesgo de incidencia en las canales del denominado olor a verraco que origina el rechazo por los consumidores de carne y productos derivados. La principal causa de este desagradable olor a orina es la deposición en tejido adiposo de androstenona y escatol, además de otros compuestos. La castración es una práctica habitual en algunos países, que no solo reduce el riesgo del olor sexual, sino que además reduce el comportamiento agresivo y facilita el manejo de los animales. Sin embargo, la castración afecta el bienestar animal y elimina la fuente natural de andrógenos que estimulan el crecimiento magro y reducen los costes de producción y la contaminación ambiental (Bonneau et al., 2000). La búsqueda de un sistema alternativo que haga posible la producción basada en machos enteros sin riesgo de olor a verraco se está investigando con diversas aproximaciones (Rius, 1999). La androstenona es una hormona esteroide cuya síntesis se produce en las gónadas, principalmente en testículos, y en glándulas suprarrenales. Posteriormente, es transportada vía sangre a las glándulas salivares donde juega su función como feromona y finalmente es metabolizada en el hígado. Por otro lado, el escatol es un indol producto del metabolismo bacteriano del triptófano que se genera en el colon y cuya degradación también se produce en el hígado. Una eliminación deficiente de estos compuestos lleva a su acumulación en tejido adiposo, que a altos niveles genera el "olor a verraco". La razón por la que se registran altos niveles de estos compuestos en algunos machos enteros y no en otros, ni se observen en machos castrados ni en hembras no está bien establecida. Desde una perspectiva genética, se han llevado a cabo varios estudios de detección de QTL demostrando la naturaleza multifactorial de este carácter (Robic et al., 2007). A pesar de que la base bioquímica de síntesis y degradación de androstenona y escatol es ampliamente conocida, la búsqueda de mutaciones causales en genes que codifican para las enzimas implicadas en estos procesos no ha sido satisfactoria (Robic et al., 2007). Con la aplicación de la tecnología de los microarrays de expresión se pretende potenciar la identificación de genes asociados con la síntesis y/o acumulación de la androstenona y escatol, aunque hasta la fecha muy pocos estudios han llevado a cabo esta aproximación (Moe et al., 2007, 2008). El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de los patrones de expresión de genes relacionados con la eliminación de la androstenona y escatol en cerdo, a través de la comparación de muestras de tejido hepático de machos enteros y hembras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de hígado analizadas en este trabajo corresponden a cerdos Ibéricos sacrificados con 7 meses de edad y 57 kg de peso medio, y pertenecientes a cinco familias de cuatro hermanos completos de la misma camada. Cada una de las familias estaba compuesta por dos individuos de cada sexo. Las muestras de ARN de hígado fueron extraídas con el kit RiboPure que proporciona una cantidad (NanoDrop) y calidad óptimas (Agilent 2100).

Microarrays: Muestras de ARN de hígado de ocho individuos, dos familias, fueron hibridadas con el chip porcino de Affymetrix (Affymetrix Porcine Genechip TM). La síntesis de ADN copia, marcajes, hibridaciones y escaneado se realizó en el hospital Vall d'Hebrón (Barcelona). La verificación de la calidad de las hibridaciones y la normalización de los datos se llevaron a cabo utilizando el paquete affyPLM y la función RMA de Bioconductor. El análisis estadístico de los datos normalizados se realizó utilizando el software Bioconductor, siguiendo el modelo: $y = \text{media} + \text{gen} + \text{sexo} + \text{error}$, estableciendo un umbral de falso descubrimiento de 0.05. La anotación de las sondas y su interpretación biológica se realizó

utilizando diversos recursos públicos (Affymetrix, NetAffy, EasyGo y David database) y el software Ingenuity Pathway Analysis.

Validación de resultados: La validación de resultados se realizó para genes relevantes en este proceso y que presentaron unas diferencias de expresión no concluyentes o no aparecieron representados en el array de expresión (*3 β -HSD*, *SULT1A1*, *TCF1*, *TCF2* y *CYB5*). La RT-PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo en todas las muestras disponibles utilizando el Sybr Green en un equipo MX3000 Stratagene y utilizando *GADPH* y *BM2* como controles endógenos. Los cálculos de la cantidades relativas de expresión se efectuaron utilizando el programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/genorm>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis comparativo de la expresión utilizando microarrays entre machos enteros frente a hembras mostraron 391 sondas diferencialmente expresadas. Once de estas sondas corresponden a diez genes relacionados con el metabolismo del la androstenona y el escatol.

La acumulación de androstenona en grasa puede ocurrir por dos vías no independientes: una elevada tasa de síntesis del esteroide en los testículos o una reducida eficiencia en su eliminación en el hígado. La base bioquímica de la eliminación de androstenona ha sido bien estudiada. Se conoce que para que el organismo elimine este esteroide se requiere de una fase de reducción por el enzima deshidrogenasa 3 β -HSD, seguida de una sulfoconjugación donde participan los enzimas SULT2A1 y SULT2B1. De éstos, sólo el gen que codifica para 3 β -HSD fue detectado como diferencialmente expresado utilizando microarrays en nuestro ensayo (Tabla 1). Este resultado fue confirmado en un mayor número de muestras por qPCR, mostrando que los machos presentan una reducción de la expresión del gen *3 β -HSD* de 0.17X, respecto a su expresión en hembras (Tabla 1). El gen *SULT1A1* no mostró diferencias de expresión significativas mediante la tecnología de microarrays de expresión. Sin embargo la validación de este resultado por qPCR en un mayor número de muestras nos permitió detectar que los machos, al igual que ocurría con el gen *3 β -HSD*, presentan una reducción en el nivel de expresión de 0.53X respecto a las hembras (Tabla 1). El gen que codifica para SULT2B1, no apareció representado en el microarray de expresión y no pudo ser validado por qPCR ya que no existe secuencia porcina disponible.

La base bioquímica de la eliminación por parte del organismo del escatol también es conocida. Existen una primera fase de oxigenación donde participan los enzimas CYP2E1 y CYP2A6, y una segunda fase de sulfoconjugación por parte de SULT1A1. En nuestro ensayo, los genes que codifican para estas tres enzimas fueron identificadas como diferencialmente expresados en los arrays en un mismo sentido: los machos presentaron niveles de expresión menores que las hembras (Tabla 1). Además de estos, los factores de transcripción que regulan la expresión del gen *CYP2E1* también son conocidos (*TCF1* y *TCF2*) y aunque no aparecían representados en el microarray, fueron analizados por qPCR (Tabla 1). Sin embargo no detectamos diferencias de expresión, por lo que esa menor expresión de *CYP2E1* en tejido hepático de machos no parece deberse a diferencias de expresión en estos factores de transcripción.

El producto del gen *CYB5* es indispensable en el proceso de síntesis de la androstenona a partir de pregnenolona en los testículos, sin embargo, se ha sugerido que este enzima también participa en el proceso de eliminación del esteroide en el hígado, además parece ser el enzima conector entre el metabolismo de androstenona y el del escatol (Moe et al., 2008). En nuestro estudio, no detectamos diferencias de expresión hepática con los datos obtenidos del análisis con microarrays, sin embargo, al validar por qPCR y aumentar el número de muestras, detectamos, al igual que en los casos anteriores, una reducción en la expresión del gen *CYB5* de 0.53X en machos (Tabla 1).

Independientemente de las posibles diferencias en la síntesis de androstenona y escatol, los resultados de expresión obtenidos en el presente trabajo, parecen indicar que en machos existe una regulación negativa de la expresión hepática de genes que codifican para los enzimas responsables de la eliminación de los principales compuestos desencadenantes del “olor a verraco”. Además de estos, en este ensayo han sido identificados como diferencialmente expresados en ambos sentidos otros seis transcritos potencialmente relacionados con este proceso (Moe et al., 2008): *IGF1*, *CYP2C18*, *RORA*, *AKR1C1*, *FMO5* y *HSD17B2* (Tabla 1).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bonneau, M., Carrié-Lemoine, J. & Mesure-Morat, M. 2000. Anim. Reprod. Sci. 15:259-263. • Moe, M., Meuwissen, T., Lien, S., Bendixen, C. Wang, X., Conley, L. N., Berget, I., Tajet, H. & Grindflek, E. 2007. BMC Genomics. 8:405. • Moe, M., Lien, S., Bendixen, C., Hedegaard, J., Hornshoj, H., Meuwissen, T. & Grindflek, E. 2008. BMC Vet. Res. 4:29. • Rius M.A. 1999. Tesis Doctoral, Univ. De Girona. • Robic, A., Nărzul, C. & Bonneau, M. 2007. Genet. Sel. Evol. 40:129-143.

Tabla 1. Resultados del análisis de expresión de genes relacionados con la deposición de androstenona y escatol en tejido hepático porcino. M = machos y H = hembras.

GEN	MICROARRAY (FDR<0.05)	Ratio M / H	qPCR (P<0.05)	Ratio M / H
<i>Relacionados con la degradación de androstenona en hígado</i>				
3β-HSD	M < H	0.56 X	M < H	0.17 X
SULT1A1	M < H	NS	M < H	0.53 X
SULT2A1	No presente	--	No validado	--
<i>Relacionados con la degradación de escatol en hígado</i>				
CYP2A6	M < H	0.06 X	No validado	--
CYP2E1	M < H	0.24 X	No validado	--
SULT1A1	M < H	0.13 X	No validado	--
TCF1	No presente	--	M = H	--
TCF2	No presente	--	M = H	--
<i>Potencialmente relacionados con la deposición de androstenona y escatol</i>				
CYB5	M < H	NS	M < H	0.53 X
IGF1	M > F	1.96 X	No validado	--
CYP2C18	M > F	27.8 X	No validado	--
RORA	M > F	1.7 X	No validado	--
AKR1C1	M < F	0.42 X	No validado	--
FMO5	M < F	0.14 X	No validado	--
HSD17B2	M < H	0.1- 0.03 X	No validado	--

Agradecimientos: Este trabajo ha sido llevado a cabo en el marco del proyecto GEN03-20658-C05 04. Agradecemos la amable colaboración recibida de COPESE SL.

DIFFERENTIAL TRANSCRIPTION BETWEEN MALES AND FEMALES OF PORCINE GENES RELATED WITH ANDROSTENONE AND SKATOLE REMOVAL IN LIVER

ABSTRACT: Boar taint is the unpleasant odour and flavour to urine-like of the cooked pig meat that is primarily caused by androstenone and skatole deposition in adipose tissue. Although the biochemical processes are well known, their genetic bases are still not clear. We have carried out a differential gene expression analysis between uncastrated pigs of both sexes using Affymetrix microarray and quantitative RT-PCR in order to investigate the expression pattern of genes related with androstenone and skatole removal in hepatic tissue. In total we have found 391 differentially expressed probes between both sexes, 11 related with androstenone and skatole metabolism, four encoding the main androstenone and skatole degradation enzymes. Androstenone degradation is performed in liver by three main enzymes, 3β-HSD, SULT2A1 and SULT2B1. In our study we have found a lower expression level of 3β-HSD (0.17X) and SULT2A1 (0.53X) genes in males than in females. In the same way, genes codifying enzymes that participate in the skatole degradation appeared downregulated in males (0.24X for CYP2E1, 0.06X for CYP2A6 and 0.13X for SULT1A1). Moreover, in previous studies it has been suggested that CYB5 enzyme participates in the androstenone synthesis in testicles but it could also participate in steroid removal in liver and it has been proposed as the enzyme connecting androstenone and skatole metabolisms. In the present study we have also found a lower expression level of CYB5 (0.53X) in males than in females. These results may indicate that males have a negative regulation of the expression levels of genes related with the degradation of the main causal components of the boar taint.

Keywords: boar taint, androstenone, skatole, gene expression

ANÁLISIS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS PARA PROLIFICIDAD EN UN CRUCE F₂ ENTRE CERDO IBÉRICO Y MEISHAN. RESULTADOS PRELIMINARES

Martínez-Giner, M.¹, Pena, RN.¹, Fernández-Rodríguez, A.², Tomàs, A.³ y Noguera, JL.¹
¹Genética i Millora Animal. IRTA. Lleida. España. ²Departamento de Mejora Genética Animal. INIA. Madrid. España. ³Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. UAB. Bellaterra. España. maria.martinez@irta.cat

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente estudio es la caracterización de la base genética de caracteres reproductivos de interés económico en porcino como son la prolificidad, el número de mamas y la supervivencia de los lechones. Para ello, disponemos de un cruce F₂ entre Meishan e Ibérico (Rodríguez *et al.*, 2005). Estas razas presentan grandes diferencias fenotípicas en los caracteres reproductivos. La raza Meishan se caracteriza por una alta prolificidad, mientras que en Ibérico el tamaño de camada es sensiblemente menor (Dèspres *et al.*, 1992; Toro *et al.*, 1986).

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el objetivo de caracterizar las diferencias en prolificidad entre hembras F₂, a nivel de expresión génica, se extrajeron un total de 63 muestras de ARN de ovario, útero e hipófisis de cerdas de alta (11.48 lechones nacidos vivos) y baja prolificidad (5.78 lechones nacidos vivos) en distintos momentos del ciclo reproductivo (celo, 15 y 45 días de gestación) tal y como se indica en la tabla 1. Este diseño nos permite realizar comparaciones de expresión génica entre tejidos, entre estados fisiológicos y entre animales de alta y baja prolificidad. La extracción de ARN total se realizó mediante el kit Ribopure (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza del ARN y su concentración fue evaluada con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y verificada en un 2100 Bioanalyzer (Agilent). Estos ARNs fueron hibridados en microchips de oligonucleótidos porcino (*GeneChip® Porcine Genome Array*, Affymetrix, 24123 sondas). La hibridación y lectura de los *microarrays* se llevó a cabo en la Unidad de soporte científico-técnico del hospital *Vall d'Hebron* de Barcelona.

Tabla 1. Distribución de muestras analizadas mediante *microarrays* por tejido (A), estado reproductivo al sacrificio (B) y prolificidad (C).

	Celo ^(B)		15 días ^(B)		45 días ^(B)		Total
	Alta ^(C)	Baja ^(C)	Alta ^(C)	Baja ^(C)	Alta ^(C)	Baja ^(C)	
Hipófisis ^(A)	4	4	3	2	3	3	19
Ovario ^(A)	4	4	4	4	3	3	22
Útero ^(A)	4	4	4	4	3	3	22
<i>Total</i>	12	12	11	10	9	9	63

Todos los *microarrays* pasaron el control de calidad realizado mediante las herramientas bioinformáticas *Bioconductor*, testándose diferentes indicadores de calidad tanto dentro como entre *microarrays*. Los datos de intensidades obtenidos en la lectura fueron procesados mediante distintos métodos de sumarización como los algoritmos MAS5, RMA y GCRMA, decidiendo utilizar los resultados obtenidos con RMA debido a su mayor robustez y a que realiza una normalización más completa de los datos. Además, fueron eliminados los datos de las sondas cuya intensidad no alcanzaba el mínimo detectable, aquellos cuya anotación era incompleta o cuyo gen no estaba anotado, así como aquellos cuyo *match score* con el gen al que pertenecen era menor de 50.

El análisis de clusters fue realizado con el software *PermutMatrix* (Caraux y Pinloche, 2005) y los datos de funcionalidad en procesos biológicos se obtuvieron con *Onto-express*, herramienta del *OntoTools* (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress/>). Para obtener la lista de genes diferencialmente expresados entre animales de alta y baja prolificidad, utilizamos el programa *EMMIX* (McLachlan *et al.* 1999), que toma la distribución de los datos como una

mezcla de distribuciones normales, y calcula la probabilidad de que cada gen pertenezca a cada una de las distintas distribuciones. En el caso de nuestros datos, se ajustaron dos distribuciones, una centrada en la media y con una menor desviación estándar que agrupa la mayor parte de los datos, y otra con mayor desviación estándar en la que se incluyen ambas colas de la distribución real. Los genes diferencialmente expresados son aquellos que presentan una mayor probabilidad de pertenecer a esta segunda distribución, con una probabilidad posterior corregida por el método *False Discovery Rate* (FDR). Este análisis se realizó por separado para cada uno de los tejidos. En los análisis previos descartamos tres de los *microarrays*, ya que provenían de un animal perteneciente al grupo de 15 días de gestación pero que probablemente no estaba gestante, por lo que no podía ser incluido en ninguno de los estados fisiológicos descritos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de clusters de los *microarrays* muestra que la mayor variación es debida al tejido, sobre todo al comparar la hipófisis con los otros dos tejidos, siendo el estado fisiológico el siguiente en el caso de útero y ovario (Figura 1A). Al realizar dicho análisis por separado para cada tejido, observamos una clara diferencia en ovario entre las hembras gestantes (15 y 45 días) y en celo, así mismo, las diferencias en el caso del útero se dan entre hembras a 45 días de gestación y el resto. En hipófisis no hay una clara distinción entre estados fisiológicos (Figura 1B).

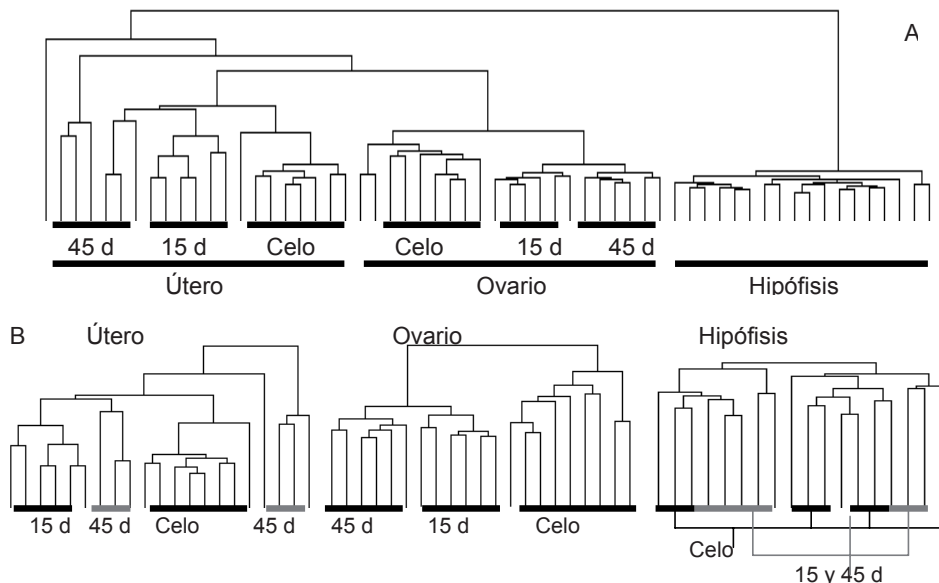


Figura 1. A: Representación de los clusters en los que se agrupan los distintos *microarrays* utilizados en el experimento. B: Representación del mismo análisis realizado por separado para cada uno de los tejidos.

Comparando los distintos estados fisiológicos en todos los tejidos, obtuvimos 496 genes diferencialmente expresados entre celo y 15 días de gestación y 816 entre 15 y 45 días de gestación. Al analizar por separado cada tejido buscando el número de genes diferencialmente expresados entre alta y baja prolificidad, obtenemos 293 genes en hipófisis, 471 en ovario y 61 en útero, tomando la probabilidad posterior correspondiente al punto de corte dado por el $FDR < 0.05$. El número de genes diferencialmente expresados en ovario es aproximadamente el doble del observado en hipófisis para una misma probabilidad posterior y es mucho menor en útero. Debido a que la comparación entre alta y baja

prolificidad es la que más nos interesa desde el punto de vista de la producción porcina, nos centraremos en ella a la hora de realizar el resto de análisis.

En cuanto al grupo funcional al que pertenecen estos genes diferencialmente expresados, la mayor parte de ellos (210 en hipófisis y 307 en ovario) pertenecen al grupo de procesos celulares (Figura 2). Sin embargo, los genes más interesantes desde el punto de vista reproductivo aparecen en dos grupos principalmente: Reproducción (con 14 genes en hipófisis y 17 en ovario) y Procesos de desarrollo (65 en hipófisis y 117 en ovario).

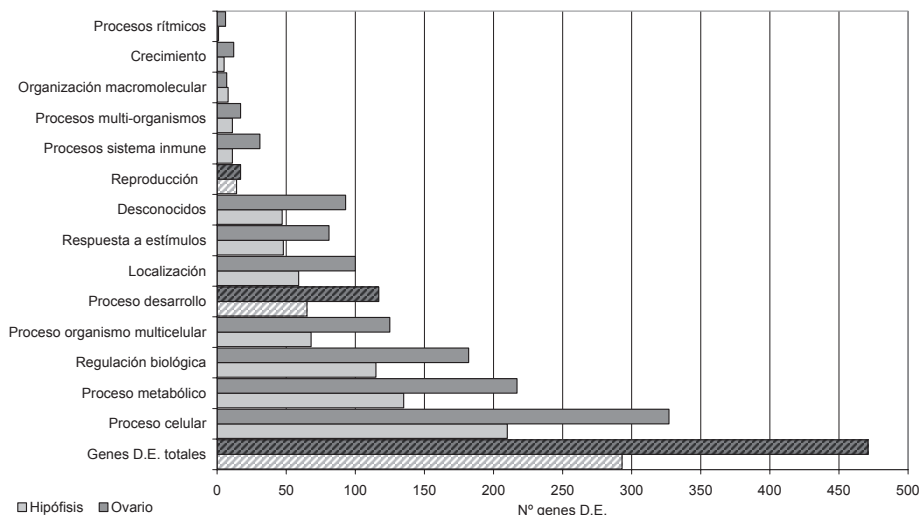


Figura 2. Representación del número de genes que pertenecen a cada uno de los grupos funcionales. Los grupos de mayor importancia y el total han sido marcados con líneas diagonales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ♦ Caraux, G. & Pinloche, S. *Bioinformatics*. 2005 21(7):1280-1281.
- ♦ Dèspres, P., Martinat-Botte, F., Lagant, H., Terqui, M. & Legault, C. *J. de la Recherche Porcine en France* 1992 24, 345-350.
- ♦ McLachlan, G.J., Peel, D., Basford, K.E. & Adams, P. J. *of Stat. Softw.* 1999, 4:2.
- ♦ Rodríguez, M.C., Rodríguez, C., Tomás, A., Alves, E., Ramirez, O., Arqué, M., Muñoz, G., Barragán, C., Varona, L., Silió, L., Amills, M. & Noguera J.L. *Anim Genet* 2005, 36:490-6.
- ♦ Toro, M.A., Dobao, M.T., Rodríguez, J. & Silió L. *Genet Sel Evol* 1986 18, 173-183.

Agradecimientos: Estudio financiado por el proyecto AGL2004-08368-C03/GAN.

MICROARRAY ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES FOR PROLIFICACY IN AN F₂ INTERCROSS BETWEEN IBERIAN AND MEISHAN PIGS. PRELIMINARY RESULTS.

ABSTRACT: We have generated an F₂ cross between *Iberian* and *Meishan* pigs, with the aim to study genes affecting reproductive traits such as prolificacy, maternal capacity and piglet survival we generated. RNA from ovary, uterus and pituitary gland from sows at different reproductive stages (heat, 15 day and 45 days of gestation) were hybridised in porcine microchips in order to characterize gene expression in sows differing in prolificacy. First results show differences between sows at different prolificacy level in pituitary gland (293 genes) and ovary (471 genes).

Keywords: microarrays, pigs, Iberian, Meishan, prolificacy

EL GEN *HMGCR* PORCINO: ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE SU PROMOTOR

Cánovas, A.¹, Quintanilla, R.¹, Reecy, J.M.², Marqués, M.³ y Pena, R.N.¹

¹IRTA. Genética i Millora Animal. Rovira Roure 191, 25198. Lleida.

²Iowa State University, Animal Science, 2255 Kildee Hall, 50011. Ames, IA, E.E.U.U.

³INDEGA, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071. León
angela.canovas@irta.cat

INTRODUCCIÓN

La **3-hidroxi-3-metilglutaril-coA reductasa (HMGCR)** es la enzima limitante en la síntesis *de novo* del colesterol, que convierte el HMG-CoA en mevalonato. Los inhibidores competitivos de la reductasa inducen la expresión de los receptores LDL en el hígado, aumentan el catabolismo de partículas LDL en plasma y reducen las concentraciones plasmáticas de colesterol, un importante factor en la etiología de la aterosclerosis.

A pesar del enorme interés de la especie porcina como modelo animal para el estudio de las enfermedades cardiovasculares en humanos (Lunney, 2007), existe un gran desconocimiento sobre la base genética del metabolismo del colesterol en porcino. En este trabajo hemos analizado estructural y funcionalmente el promotor del gen *HMGCR* porcino en relación a la variación de los niveles de lípidos plasmáticos en cerdos, mirando también su asociación con el engrasamiento y la cantidad y composición de la grasa intramuscular. Se ha realizado un estudio funcional adicional del gen *HMGCR* porcino, describiendo el nivel relativo de expresión en varios tejidos relacionados con la lipogénesis y estudiando la respuesta del promotor a varias sustancias activadoras o inhibidoras de su transcripción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El material animal utilizado en el presente estudio procede de una línea comercial Duroc con alto contenido de grasa intramuscular utilizada en la producción de jamón curado de calidad, y consta de una población de 350 cerdos castrados distribuidos en cinco familias de medios hermanos. Durante el periodo de cebo se registraron regularmente el peso y el espesor de grasa dorsal, y se tomaron dos muestras de sangre (a los 45 y 190 días de edad) en las que se midieron las concentraciones de colesterol, HDL, LDL y triglicéridos. Al sacrificio (sobre los 120 kg de peso vivo y 190 días de edad) se tomaron muestras de los músculos Longissimus Dorsi y Gluteus Medius sobre las que se midieron el porcentaje de grasa intramuscular y la composición en ácidos grasos.

Caracterización del promotor proximal; identificación y genotipado de polimorfismos

Para caracterizar el promotor proximal del gen *HMGCR* se amplificó un fragmento de 600 bp a partir de 20 ng de DNA genómico y un par de primers diseñados a partir de secuencias homólogas mediante Primer Express software (Applied Biosystem).

Construcción plásmidos y comprobación activadores / inhibidores

Preparamos dos construcciones híbridas con los dos alelos del SNP del promotor del gen *HMGCR* porcino seguido de una cassette de expresión con Luciferasa *Renilla.L.* Comprobamos la activación/inhibición de la expresión del gen *HMGCR* mediante la adición de diferentes tratamientos (insulina, colesterol, suero y forskolin) en las dos líneas celulares: HepG2 (células de carcinoma de hígado humano) y C2C12 (células de músculo de ratón). Los ensayos luciferasa se realizaron en el luminómetro TD-20/20 (Turner Designs).

Análisis de Expresión

Estudiamos la expresión del gen *HMGC*R en los 70 animales más extremos para parámetros de engrasamiento y calidad de carne, en músculo (mediante hibridación en un microchip de ADN porcino (*Affymetrix*)) y en hígado (mediante qPCR (ABI-7500)). Además, describimos por qPCR el nivel relativo de expresión del gen *HMGC*R porcino en varios tejidos relacionados con la lipogénesis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del promotor proximal del gen *HMGC*R

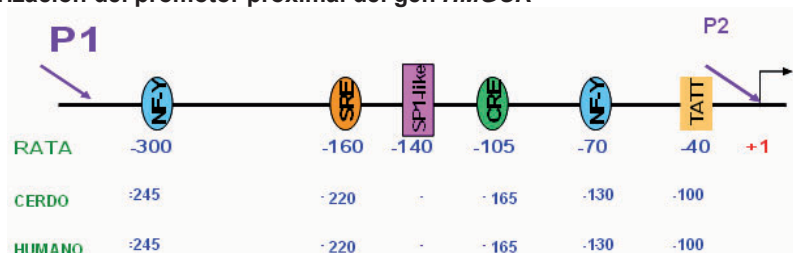


Figura 1. Posición de elementos reguladores en promotores *HMGC*R

El análisis de la región promotora amplificada indicó que el promotor del gen *HMGC*R muestra un alto grado de conservación (entre el 75 y el 88%) con los promotores de otros mamíferos (*Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*). Es más, la localización de las zonas de unión potenciales a los factores de transcripción CREB, NF-Y y SRE están conservadas respecto al promotor humano y de rata (Figura 1).

También identificamos dos polimorfismos tipo SNP (P1/P2 en la Figura 1) cuyo análisis *in silico* reveló que el primero de ellos afecta a una posible secuencia diana para factores de transcripción de la familia bHLH de reguladores de la miogénesis, mientras que la segunda mutación afecta a la secuencia consenso para el factor de transcripción Ets-2. La unión de ambos factores de transcripción al promotor *HMGC*R no ha sido demostrada todavía en ninguna especie.

Actividad transcripcional del promotor *HMGC*R porcino

De los cuatro reactivos testados, la insulina y la reducción del porcentaje de suero dieron lugar a la activación del promotor *HMGC*R porcino por encima de los niveles basales. En cambio, el 25-hidroxicolesterol y el forskolin ejercían una fuerte inhibición de la actividad de este promotor.

También estudiamos la actividad transcripcional asociada a los diferentes polimorfismos encontrados en el promotor proximal del gen *HMGC*R porcino en diferentes condiciones de activación / inhibición. En las células C2C12 y HepG2 transfectadas observamos que la insulina (1 μ M) activaba más el promotor *HMGC*R porcino en el alelo G, mientras que el 25-hidroxicolesterol (12.5 μ M) inhibía más la actividad en el alelo G.

Correlación entre expresión y caracteres de calidad de la carne

Estudiamos la correlación entre la expresión analizada en músculo e hígado y diversos medidas de lípidos plasmáticos, engrasamiento y cantidad y composición de la grasa intramuscular, obteniendo una asociación significativa de la expresión en músculo con los triglicéridos y el colesterol HDL y LDL séricos, el porcentaje de magro y de grasa intramuscular, y el contenido en ácidos oleico, linoleico, esteárico y palmítico. Por el

contrario, los niveles de expresión en hígado tan solo mostraron una asociación significativa con el colesterol HDL plasmático, el porcentaje de magro y contenido en ácido esteárico.

En músculo, la expresión del gen *HMGCR* fue mayor en el grupo de animales con valores altos para parámetros lipídicos que en el grupo con valores bajos ($p < 0.001$), mientras que en hígado los dos grupos no difirieron en los niveles de expresión de este gen.

Perfil de expresión del gen *HMGCR* porcino

Hemos investigado la expresión relativa del gen *HMGCR* en seis tejidos lipogénicos de cerdo adulto (hígado, grasa subcutánea, músculo *gluteus medius* (GM), músculo *longissimus dorsi* (LD), corazón y duodeno). Los resultados indican que la expresión máxima se obtiene en grasa y duodeno, mientras que corazón e hígado presentan niveles inferiores de expresión.

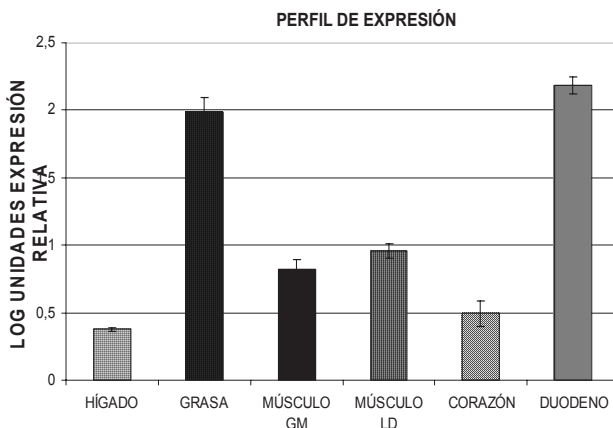


Figura 2. Perfil de expresión del gen *HMGCR* porcino.

CONCLUSIÓN

El gen *HMGCR* juega un papel importante en la variabilidad genética del metabolismo lipídico y del colesterol en porcino, mostrando además una asociación con la cantidad y composición de la grasa intramuscular, presentándose así como un posible gen candidato para la mejora genética de la calidad de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Davis et al. 1995 J Anim Science 73:310. • Tong et al. 2004. Lipids 39:239-341. • Zhang et al. 2007. J Anim Sci.85:583-591. Lunney 2007. Int J Biol Sci 3:179.

Agradecimientos: Este proyecto ha sido financiado por el MEC (GEN2003-20658-C05-05 y AGL2007-66707-C02-01). Agradecemos a D. Almuzara su apoyo técnico y a Selección Batallé su cooperación en la obtención del material animal. A. Cánovas disfruta de una beca pre-doctoral INIA.

THE PIG *HMGCR* GENE: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDY OF THE PROXIMAL PROMOTER

ABSTRACT: *HMGCR* is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of cholesterol. We have studied the role of the *HMGCR* gene in pig lipid metabolism by means of expression and structural analysis. *In vitro* studies in liver- and muscle-derived cells indicated that *HMGCR* promoter contains elements which drive response to insulin, sterols and growth factors. Comparison of expression in several tissues showed that *HMGCR* expression was maximal in fat and duodenum and lowest in liver. Moreover, muscle (but not liver) expression correlated with several fattness, growth and meat quality traits, indicating that *HMGCR* may play an interesting role in the genetic variability of lipid and cholesterol metabolism in pigs.

Key words: pig, meat quality, gene expression, cell culture.

EFFECTO DE LA SELECCIÓN CONTRA GRASA DORSAL A GRASA INTRAMUSCULAR CONSTANTE EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS ENZIMAS ACC Y SCD PORCINAS.

Cánovas, A.¹, Tor, M.², Pena, RN.¹, Doran, O.³ y Estany, J.²

¹IRTA. Genètica i Millora Animal. Rovira Roure, 191, 25198. Lleida.

²Universitat de Lleida. Departament de Producció Animal. Rovira Roure, 191, 25198. Lleida.

³Institute of Bio-Sensing Technology, University of West of England, BS16 1QY Bristol, UK.
angela.canovas@irta.cat

INTRODUCCIÓN

La industria del porcino lleva muchos años mejorando el contenido de magro de la canal mediante selección contra el espesor de grasa dorsal (GD). Dado que la correlación genética entre el espesor de grasa dorsal y el contenido de grasa intramuscular (GIM) es positiva (Solanes et al., 2009), la selección contra GD ha reducido GIM hasta valores que mayoritariamente se sitúan por debajo de los recomendados en la producción de curados de calidad. Un objetivo del sector es, por tanto, disponer de metodologías de selección que permitan manipular GD y GIM de forma independiente.

El objetivo del presente trabajo es investigar si la selección contra GD a GIM constante se relaciona con cambios en la expresión de los enzimas lipogénicas acetyl-CoA carboxylase (ACC), stearoyl-CoA desaturase (SCD) y $\Delta 6$ -desaturase ($\Delta 6d$), los cuales intervienen, respectivamente, en la biosíntesis de los ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental. Se han utilizado 20 cerdos Duroc, diez de ellos elegidos al azar del grupo S, seleccionado contra GD a GIM constante y diez al azar del Grupo C, control no seleccionado. Se procuró que el peso vivo fuera lo más parecido entre grupos. Los cerdos de cada grupo se eligieron utilizando tan sólo la predicción del valor genético de su camada para GD, peso vivo y GIM en *m. gluteus medius* a los 180 días de edad, según se describe en Reixach et al. (2008). Estos autores comprobaron que los cerdos S tenían efectivamente menos GD que los C, pero no GIM. Inmediatamente después del sacrificio, a los 200 días de edad, se recogió una muestra de grasa subcutánea (SB) y una de *m. semimembranosus* (SM), que fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas luego a -80°C.

Análisis de ácidos grasos. La composición de ácidos grasos se determinó por duplicado mediante determinación cuantitativa de los ácidos grasos individuales por cromatografía de gases, según el protocolo descrito en Tor et al. (2005). El contenido de GIM en SM se calculó como la suma de los ácidos grasos, expresado como equivalentes en triglicéridos (AOAC 2000) sobre materia seca.

Aislamiento de las fracciones microsomales y citosol. La expresión de las enzimas SCD y $\Delta 6d$ se determinó en la fracción microsomal, mientras que la del ACC en la citosólica. Microsomas y citosol fueron aislados por centrifugación diferencial. Los microsomas fueron obtenidos por centrifugación a 25.000 x g, durante 35 min. El sobrenadante (citosol) se recogió y la fracción microsomal precipitada fue resuspendida en buffer 10 mM Tris-HCl, 250 mM KCl (pH 7,4) e inhibidores de enzimas proteolíticas. El contenido total de proteína en los microsomas y citosol se determinó utilizando el método de Bradford usando albúmina sérica bovina como estándar.

Expresión proteica. La expresión de las tres enzimas se analizó mediante Western Blot, a partir de 6 μ g de microsoma y citosol. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas en una membrana de nitrocelulosa (Protan, Schleicher y Schell), según se describe en Nicolau-Solano et al. (2006). Los blots fueron revelados con el reactivo quimioluminiscente ECL (GE Healthcare) y se cuantificó con el programa ImageQuant (Molecular Dynamis). Todos los análisis de expresión proteica se hicieron por duplicado.

Análisis estadísticos. El efecto de la selección practicada sobre la expresión de las enzimas ACC, SCD y $\Delta 6d$ se contrastó, mediante un test t ($p < 0.05$), las diferencias entre grupos para GD y GIM. Se realizó un análisis de regresión dentro de grupo y entre grupos para analizar la asociación de GIM y su composición en ácidos grasos con la expresión de las enzimas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se han observado diferencias entre grupos en la expresión de ninguna de las tres enzimas en SM pero si en la de ACC y SCD en SB (Figura 1). Reixach et al. (2008) han mostrado que es posible reducir GD mediante selección sin modificar GIM. Se desconocen los cambios fisiológicos que una selección de este tipo ejerce sobre los mecanismos de regulación de la distribución de la grasa corporal. En el presente trabajo se muestra que este tipo de selección tiende a reducir la expresión de ACC y SCD en SB pero no en SM (Figura 1A y 1B), sin que por ello se vea alterada la expresión de $\Delta 6d$, ni en SM ni en SB (Figura 1C). Estos resultados sugieren, por una parte, que las enzimas ACC y SCD ejercen un papel más relevante en la regulación de la deposición de la grasa que la $\Delta 6d$ y, por otra, que el control de la biosíntesis de SFA y MUFA es más determinante que el de PUFA en la formación de la grasa a edades de sacrificio tardías.

No se ha detectado ninguna relación significativa entre la expresión de ninguno de los tres enzimas con el contenido de SFA, MUFA o PUFA en SB. No obstante, los resultados indican que la selección practicada puede haber provocado un cambio de tendencia en la asociación entre la expresión proteica de SCD y el contenido en MUFA en SB, de tal forma que la relación pasa de negativa en los cerdos más grasos del grupo C ($r = -0.68$, $p < 0.05$) a no significativa en los más magros del grupo S ($r = 0.48$, $p = 0.20$). No se detecta tampoco ninguna relación significativa entre la expresión de ACC y $\Delta 6d$ en SM con el contenido y composición de GIM. Por el contrario, los resultados para SCD en SM confirman que la expresión de SCD se relaciona positivamente con el contenido de GIM en SM, así como con el de MUFA y el ratio C18:0/C18:1 (Figura 2). En efecto, Doran et al. (2006) observaron que en porcino la expresión y la actividad de ambas enzimas tienen una relación positiva con el contenido de GIM. El papel que desempeñan otras enzimas lipogénicas en la formación de GIM aun no esta del todo clara.

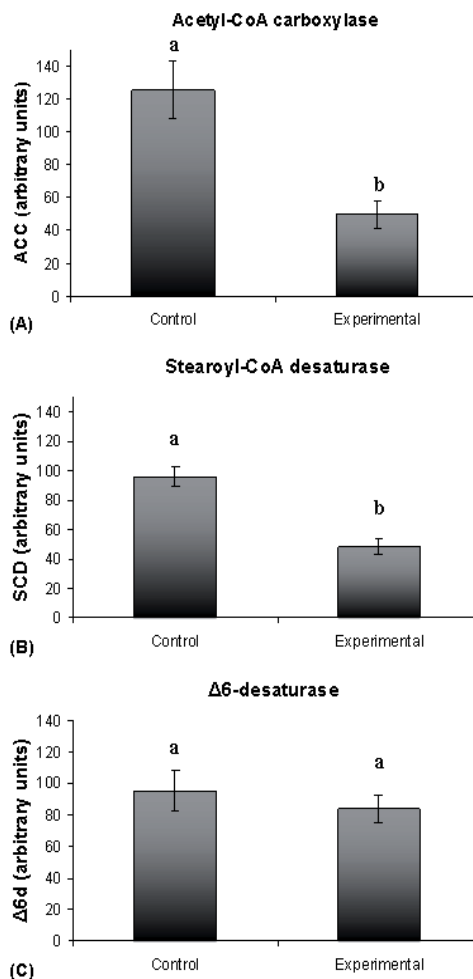


Figura 1. Expresión proteica de SCD, ACC y $\Delta 6d$ en grasa subcutánea.

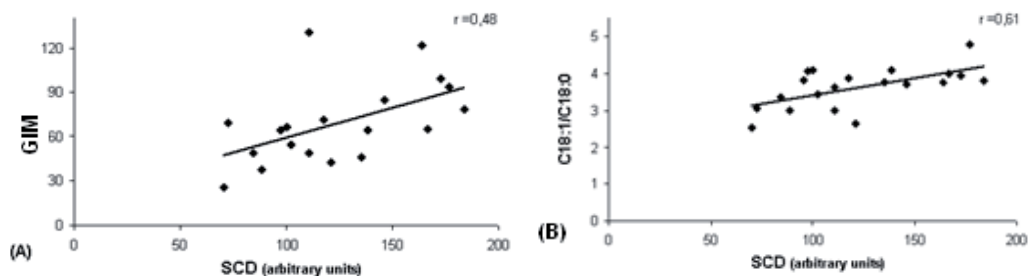


Figura 2. Relación entre la expresión proteica de SCD y el contenido de grasa intramuscular (mg/g MS, $P < 0.05$) y del ratio C18:1/ C18:0 ($p < 0.01$) en *m. semimembranosus*.

Se ha caracterizado el perfil de expresión de las tres enzimas en ocho tejidos: grasa subcutánea, grasa abdominal, *m. rectus capitis* y *m. semimembranosus*, diafragma, corazón, hígado y riñón. Se ha observado que las tres enzimas están presentes en los ocho tejidos analizados. El tejido adiposo, tanto en el subcutáneo como en el abdominal, fue dónde las enzimas ACC y SCD se expresaron más, lo que es consistente con el papel fundamental que ambas desempeñan en la biosíntesis de lípidos (Ntambi y Miyazaki, 2004). El enzima $\Delta 6\delta$ se expresó de forma más equilibrada entre tejidos y se expresó incluso más en el riñón que en el tejido adiposo subcutáneo.

La medición del contenido de GIM y de su composición es metodológicamente larga y costosa, pero, por otra parte, necesaria para seleccionar con éxito GD y GIM de forma independiente. La identificación de genes y/o biomarcadores asociados con los procesos de formación de la grasa puede ser de utilidad para el diseño de criterios de selección que permitan seleccionar contra GD a GIM constante o, alternativamente, a favor de GIM sin aumentar GD. Los resultados del presente estudio sugieren que la selección contra SCD y ACC en SB podría ser una forma de abordar el problema y que la expresión de SCD en SM una forma de medir el contenido en GIM y MUFA en músculo.

Agradecimientos: Proyecto financiado por el MEC (AGL2006-01243). Agradecemos a Teresa Giró, Anna Naco y Laura Frutos su ayuda en los análisis de laboratorio y al equipo de Selección Batallé su cooperación en el experimento. A. Cánovas disfruta de una beca pre-doctoral INIA. La expresión de las enzimas lipogénicas se hizo en la Universidad de Bristol, Reino Unido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. 2000. OMA
- Doran et al. 2006. Br J Nutr 95, 609-17
- Nicolau-Solano et al. 2006. J Anim Sci 84, 2809-17
- Ntambi J.M. & Miyazaki M. 2004. Prog Lipid Res 43, 91-104
- Reixach et al. 2008. 54th ICOMST, p.9.13
- Solanes et al. 2008. Livestock Science
- Tor et al. 2005. Animal Research 54, 413-24.

EFFECT OF SELECTION AGAINST BACK FAT WITH CONSTANT IMF IN ACC AND SCD PROTEIN EXPRESSION IN PIG.

The determination of the IMF and its composition is necessary to select independently for IMF and back fat thickness successfully. The identification of genes and/or biomarkers associated with the fat deposition is important for the development of selection criteria for IMF. The results of this study suggest that selection against ACC and SCD in SB could be a way of tackling the problem. Analysis of SCD expression in muscle could be used to predict IMF and MUFA content.

Key words: intramuscular fat, genetic selection, pig.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE COEFICIENTES ESPECÍFICOS DE DEPRESIÓN ENDOGÁMICA ASOCIADOS A FUNDADORES

Varona, L., Moreno, C. y Altarriba, J.

Unidad de Genética Cuantitativa y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria. 50013.

Zaragoza.lvarona@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La consanguinidad se define como la probabilidad de identidad por descendencia en locus autosómico causada por el apareamiento de individuos emparentados (Wright, 1922, Malecot, 1948). La consanguinidad ha sido frecuentemente asociada a modificaciones en la media y en la varianza de los caracteres cuantitativos tanto en poblaciones naturales como experimentales (Charlesworth y Charlesworth, 1987, Keller y Waller, 2002).

Recientemente, algunos estudios han propuesto modelizar la depresión endogámica mediante coeficientes parciales asociados a los individuos fundadores (Lacy et al., 1996). Esta aproximación permite asociar efectos de la depresión endogámica específicos y sus asunciones han sido confirmadas en diversos caracteres de porcino (Rodríguez et al., 1998, Casellas et al., 2008), ovino (Casellas et al., 2008), vacuno de leche (Gulisija et al., 2006) y vacuno de carne (Carolino y Gama, 2008).

Cuando el número de fundadores es elevado, los efectos específicos de depresión endogámica pueden ser modelizados mediante distribuciones paramétricas (Casellas et al., 2008), que facilitan su expansión a un ámbito multivariante. El objetivo de este trabajo es definir un modelo multivariante de análisis de coeficientes específicos de depresión endogámica y presentar los resultados de su aplicación a seis caracteres productivos de la raza bovina Pirenaica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se han utilizado datos de peso al nacimiento (PN), peso a los 120 días (P120) y peso a los 210 días (P210), proporcionados por CONASPI- Confederación Nacional de Asociaciones de Vacuno Pirenaico, y Peso de la canal fría (PC), Conformación (CONF), Cobertura Grasa (CG), procedentes del Sistema Nacional de Identificación y Movimiento de Ganado Bovino (SIMOGAN). Una descripción más amplia de los mismos puede encontrarse en Altarriba et al. (2009).

Los coeficientes de consanguinidades parciales y totales fueron calculados mediante el programa ENDOG (Gutiérrez y Goyache, 2005). La consanguinidad total para el *iesimo*

individuo (F_i) se subdividió mediante $F_i = \sum_{j=1}^f F_{ij}$, donde F_{ij} es la probabilidad de identidad

por descendencia atribuida al *iesimo* fundador en el *iesimo* individuo. Además, f es el número de fundadores. Para el estudio se seleccionaron los 150 fundadores más representados en la población actual.

El modelo estadístico de análisis fue:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \sum_{i=1,150} \mathbf{F}_i \mathbf{c}_i + \mathbf{F}_R \mathbf{c}_R + \mathbf{e}$$

Donde \mathbf{y} es el vector de datos fenotípicos (PN, P120, P210, PC, CONF y CG), \mathbf{b} es el vector de efectos sistemáticos (estación, año, sexo, rebaño y covariada con la edad), \mathbf{u} es el vector de valores mejorantes y \mathbf{e} es el vector de residuos. \mathbf{F}_i es el coeficiente de consanguinidad parcia y \mathbf{F}_R es el coeficiente de consanguinidad residual,

$$\mathbf{F}_R = \mathbf{F} - \sum_{i=1,150} \mathbf{F}_i$$

Además, \mathbf{c}_i es el efectos de depresión consanguínea asociado al individuo i , y \mathbf{c}_R es el efecto de depresión endogámica residual y \mathbf{X} y \mathbf{Z} son las matrices de indidencia que ligan los efectos sistemáticos, genéticos aditivos y rebaño con el vector de datos.

El modelo se analizó mediante un análisis bayesiano utilizando muestro de Gibbs. Se asumieron las siguientes distribuciones a-priori para los efectos rebaño, genéticos aditivos y de depresión endogámica:

$$\mathbf{u} \sim N(0, \mathbf{A} \otimes \mathbf{G}) \quad \mathbf{c} \sim N(\mathbf{m}, \mathbf{I} \otimes \mathbf{D}) \quad \mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I} \otimes \mathbf{R})$$

Donde \mathbf{G} , \mathbf{D} y \mathbf{R} son las matrices de varianzas y covarianzas entre efectos genéticos aditivos, rebaños, de depresiones endogámicas asociadas a los fundadores y residuales, respectivamente. Además \mathbf{m} es el vector de las media de la depresión endogámica. Las distribuciones a-priori para \mathbf{G} , \mathbf{D} , \mathbf{R} , \mathbf{m} y \mathbf{b} fueron uniformes. En al análisis se realizaron 225,000 iteraciones y se descartaron las 25,000 primeras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medias y desviaciones típicas posteriores para los componentes de varianza y las correlaciones genéticas aditivas y de depresión endogámica se presentan en las tablas 2 y 3, respectivamente. Los resultados obtenidos se localizan en el rango de valores habitual en la bibliografía, tanto en esta población (Altarriba et al., 2009), como en otras poblaciones (Rios-Utrera y Van Vleck, 2004).

Las correlaciones entre depresiones endogámicas fueron del mismo signo que las correlaciones genética aditivas, aunque en algunos casos las distribuciones de probabilidad posterior fueron claramente diferentes (PN y P210). Este resultado prueba los genes que regulan la correlación genética aditiva y la correlación entre depresiones consanguíneas no son los mismos, o, al menos, operan de manera diferente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altarriba, J., Yague, G., Moreno, C. & Varona, L. 2009. Exploring possibilities of the traceability data for genetic improvement in the Pirenaica Beef Cattle Breed. *Lives. Sci.* (Submitted).
- Carolino, N. & Gama, L. T. 2008. Inbreeding depression on beef cattle traits: Estimates, linearity of effects and heterogeneity among sire-families. *Genet. Sel. Evol.* 40: 511-527.
- Casellas, J., Piedrafita, J., Caja, G. & Varona, L. 2009. Bayesian analysis of founder-specific inbreeding depression on birth weight in Ripollesa lambs. *J. Anim. Sci.* 87:72-79.
- Casellas, J., Varona, L., Ibañez-Escriche, N., Quintanilla, R. & Noguera, J. L. 2008. Skew distribution of founder-specific inbreeding depression effects on the longevity of Landrace sows. *Genetics Research* 90:499-508.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 18:237-268.
- Gulisija, D., Gianola, D., Weigel, K. A. & Toro, M. A. 2006. Between-founder heterogeneity in inbreeding depression for production in Jersey cows. *Lives. Prod. Sci.* 104:244-253.
- Gutiérrez, J. P. & Goyache, F. 2005. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *J. Anim. Breed. Genet.* 122:172-176.
- Keller, L. F. & Waller, D. M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution.* 17:230-241.
- Lacy, R. C., Alaks, G. & Walsh, A. 1996. Hierarchical analysis of inbreed depression in *Peromyscus polionotus*. *Evolution* 50:2187-2000.
- Malécot, G. 1948. *Les Mathématiques de l'Heredité*. Paris:Masson.
- Rios-Utrera, A. & Van-Vleck, L. D. 2004. Heritability estimates for carcass traits of cattle: a review. *Genet. Mol. Res.* 3:380-394.
- Rodríguez, J., Toro M. A., Rodríguez, M. C. & Silió, L. 1998. Effect of founder allele survival and inbreeding depression on litter size in closed line of Large White pigs. *Animal Science* 67:573-582.
- Wright, S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist* 56:330-338.

Tabla 1. Medias y desviaciones típicas posteriores para los componentes de varianza y la depresión endogámica media para PN, P120, P210, PC, CONF y CG

	PN	P120	P210	PC	CONF	CG
σ_a^2	7.19 (0.21)	338.87 (14.70)	686.07 (38.26)	445.88 (30.84)	0.044 (0.004)	0.028 (0.003)
$\sigma_d^{2\ 1}$	1.69 (0.64)	111.78 (44.64)	414.04 (200.03)	125.57 (52.43)	0.016 (0.010)	0.010 (0.007)
σ_c^2	14.05 (0.16)	629.60 (11.24)	1283.91 (30.44)	839.36 (23.43)	0.112 (0.003)	0.127 (0.003)
Media ¹	-0.31 (0.15)	-2.67 (1.27)	-4.91 (2.43)	-6.24 (1.53)	0.008 (0.018)	-0.028 (0.016)

¹ La media y la varianza de los efectos de depresión endogámica están referidos a $f=0.10$

Tabla 2. Medias y desviaciones típicas posteriores para las correlaciones genéticas aditivas (sobre la diagonal) y de depresión consanguínea (bajo la diagonal) para PN, P120, P210, PC, CONF y COL.

	PN	P120	P210	PC	CONF	CG
PN	-	0.30 (0.02)	0.26 (0.03)	0.51 (0.03)	0.11 (0.05)	-0.06 (0.06)
P120	0.46 (0.23)	-	0.80 (0.02)	0.43 (0.04)	-0.10 (0.05)	0.09 (0.06)
P210	0.64 (0.20)	0.74 (0.16)	-	0.54 (0.04)	-0.09 (0.06)	0.20 (0.06)
PC	0.32 (0.34)	0.18 (0.31)	0.22 (0.33)	-	0.40 (0.05)	-0.12 (0.07)
CONF	0.09 (0.35)	0.02 (0.35)	0.27 (0.35)	0.35 (0.31)	-	-0.24 (0.07)
CG	0.07 (0.42)	0.05 (0.39)	0.04 (0.40)	0.18 (0.39)	-0.35 (0.39)	-

CORRELATION BETWEEN FOUNDER SPECIFIC INBREEDING DEPRESSION EFFECTS IN BEEF CATTLE.

ABSTRACT: Inbreeding has been associated with reduction of fitness. Recently, some studies detect founder-specific variability in terms of inbreeding depression, which has been modeled with parametric distributions. This study expands the parametric modelization of founder specific inbreeding depression to a multivariate framework and applied the proposed procedure to six traits of the Pirenaica beef cattle breed.

Keywords: Inbreeding, Multivariate Analysis, Beef cattle.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES MEDIDAS EN DOS CORTES COMERCIALES DE AVILEÑA NEGRA IBÉRICA

López de Maturana, E., Carabaño, M. J. y Díaz, C.

Dpto. de Mejora Genética Animal, INIA, Madrid

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la producción de carne está cada vez más orientada hacia la calidad de los productos por exigencia de los propios consumidores. Las Marcas de Calidad e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) constituyen una buena estrategia de producción, diferenciación y promoción. Una de las IGP con mayor aceptación en el mercado es la 'Carne de Ávila', procedente de animales pertenecientes a la raza autóctona Avileña Negra Ibérica o a cruces de reproductoras de esta raza y sementales de aptitud cárnica.

Después de las características higiénicas y nutricionales, la percepción sensorial sería el principal criterio para comprar carne (Sañudo et al., 2000). Al igual que en otras especies, las características de las fibras musculares juegan un papel importante en la evolución post mortem y por tanto, en las propiedades sensoriales de la carne de vacuno, en especial en la ternera (Valin, 1988). En Avileña-Negra Ibérica, Moreno-Sánchez et al. (2008) caracterizaron las diferencias fibrilares de dos músculos (*Psoas major* y *Flexor digital*) que constituyen la base de dos cortes comerciales de muy diferente valor y percepción en el mercado: el solomillo (S) y el morcillo (M), respectivamente, y determinaron que el *Flexor digital* es un músculo oxidativo mientras que el *Psoas major* es un músculo de tipo mixto.

El objetivo de este estudio fue analizar genéticamente los caracteres sensoriales de estos dos cortes comerciales, y determinar si existe heterogeneidad de varianzas, mediante una comparación de modelos tanto a nivel predictivo como de ajuste.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos. El diseño experimental tuvo como objetivo formar al menos 40 familias de medios hermanos de padre, escogiendo 400 terneros nacidos entre los años 2002 y 2004 procedentes de 6 cebaderos con un mismo régimen de alimentación y controlados por la Asociación de Avileña Negra Ibérica. Los terneros fueron sacrificados a un peso medio de 500 Kg, 425 días de edad y tras una media de 196 días de engorde. Después del sacrificio, las canales fueron refrigeradas a 4°C durante las primeras 24 horas post mortem y se obtuvieron muestras del solomillo y el morcillo. Las muestras fueron envasadas al vacío, maduradas durante 7 días y posteriormente congeladas. Tras la descongelación en cámara refrigerada, las muestras fueron cocinadas siguiendo diferentes protocolos de cocinado para cada corte comercial. Las muestras fueron juzgadas por un panel entrenado de 10 catadores en las dependencias del Consejo Regulador, los cuales valoraron los atributos olor, color, flavor, ternera, jugosidad y aceptación en una escala de 1-7.

Análisis. Los caracteres sensoriales fueron analizados mediante modelos animales univariados de 2 tipos:

- 1) Homocedástico: se considera que la varianza residual es común para los dos músculos.
- 2) Heterocedástico: postula que la varianza residual es heterogénea en función del músculo.

La expresión general del modelo es

$$\mathbf{y}_m = \mathbf{X}\mathbf{b}_m + \mathbf{z}\mathbf{u}_m + \mathbf{z}_p\mathbf{p}_m + \mathbf{e}_m$$

donde \mathbf{y}_m es el vector que contiene los datos sensoriales de ambos músculos; $\mathbf{X}\mathbf{b}_m$ es la contribución de los siguientes efectos sistemáticos: combinación entre año y estación de cebo (10 niveles), grupo de edad al sacrificio (3 niveles), músculo (2 niveles), catador (10 niveles) y sesión de cata (23 niveles); $\mathbf{z}\mathbf{u}_m$ es la contribución del efecto genético del ternero, $\mathbf{z}_p\mathbf{p}_m$ representa la aportación del efecto permanente del ternero y \mathbf{e}_m representa el vector de residuos. Las distribuciones a priori asumidas para los efectos de localización fueron:

$$\mathbf{b} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_b^2), \sigma_b^2 = 10^6; \mathbf{u} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_u^2); \mathbf{p} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_p^2); \mathbf{e}_m \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_{e_m}^2) \left\{ \begin{array}{l} m=1 \text{ homocedástico} \\ m=1,2 \text{ heterocedástico} \end{array} \right.$$

mientras que para los de dispersión se asumieron distribuciones Chi cuadradas invertidas con 4 grados de libertad.

Los modelos fueron analizados usando metodología bayesiana vía implementación MCMC. Tras análisis preliminares, se decidió lanzar una única cadena de 1.000.000 muestras, de las cuales se descartaron las primeras 100.000 y se conservaron 1 de cada 50 muestras para el post análisis.

Post análisis. Se realizó mediante el paquete BOA (<http://www.public-health.uiowa.edu/boa>), y se evaluó la convergencia de las cadenas mediante su inspección visual, y usando el criterio de Geweke.

Comparación de modelos. Se realizó tanto en términos de bondad de ajuste, a través del cálculo una aproximación del Factor de Bayes (FB), como en habilidad predictiva, mediante el cálculo de las densidades predictivas en una validación cruzada, puesto que un modelo que ajuste bien los datos puede fallar en la predicción de datos futuros (Sorensen y Gianola, 2002). Detalles del cálculo de ambos criterios pueden encontrarse en (López-Romero et al., 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El $IMD_{95\%}$ de la diferencia entre los efectos de los cortes S y M tras el análisis de los modelos homo y heterocedásticos (ver Tabla 1) fue muy similar y no contuvo el 0, indicando que las características sensoriales difieren entre músculos.

En relación a las varianzas, se obtuvieron similares estimas en ambos modelos para todos los parámetros excepto para la varianza residual en los análisis del color, terneza, jugosidad, flavor y aceptación. Los intervalos mínimos de densidad máxima al 95% ($IMD_{95\%}$) de las varianzas residuales en el caso del modelo 2 se solaparon para los caracteres de olor, color y flavor (Tabla 2). Las medias posteriores de las heredabilidades en ambos análisis fueron bajas y dentro del rango de valores presentados en otras razas (Dikeman et al., 2005, Renand et al., 2006) y en un estudio preliminar en esta misma población (Moreno-Sánchez et al., 2006).

Respecto a la comparación de modelos (Tabla 3), el modelo homocedástico se vio favorecido en términos de bondad de ajuste únicamente para el olor, mientras que el modelo que postula heterogeneidad de varianzas mostró un mejor ajuste en el análisis del resto de caracteres sensoriales. En cuanto a la habilidad predictiva, ambos modelos se comportaron de manera similar.

Los resultados de este estudio revelan la diferencia que existe entre los caracteres sensoriales medidos en cortes comerciales de calidad tan diferente como el solomillo y morcillo, así como la existencia de heterogeneidad de varianzas en todos los caracteres excepto el olor, confirmando el diferente comportamiento post mortem en ambos cortes con implicaciones en su calidad.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA-FEDER: RTA01-054. Los autores agradecen a la Asociación de ganaderos de Avileña- Negra Ibérica y al Consejo Regulador de Carne de Ávila por su participación en la obtención y cesión de los datos, y a Natalia Moreno-Sánchez por sus comentarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dikeman, M. E., E. J. Pollak, Z. Zhang, D. W. Moser, C. A. Gill, & E. A. Dressler. 2005. *J. Anim. Sci.* 83:2461-2467.
- López-Romero, P., R. Rekaya, & M. J. Carabano. 2003. *J. Dairy Sci.* 86(10):3374-3385.
- Moreno-Sánchez, M., C. Díaz, M. J. Carabaño, J. Rueda, y J.-L. L. Rivero. 2008. *BMC Cell Biology* 9:67-82.
- Moreno-Sánchez, M., A. Moreno, M. J. Carabaño, M. T. Fernández, & C. Díaz. 2006. en 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Brasil.
- Renand, G., A. Malafosse, F. Ménissier, H. Leveziel, J. F. Hocquette, J. Lepetit, S. Rousset, C. Denoyelle, & V. Dodelin. 2006. en 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, MG, Brasil. •

Sorensen, D. A. & D., Gianola. 2002. Vol. 1. Springer- Verlag New York, Inc., 175 Fifth Avenue, New York. • Valin, C. 1988. *Reprod. Nutr. Dev.* 28:845-856.

GENETIC ANALYSIS OF MEAT QUALITY TRAITS IN AVILEÑA NEGRA IBERICA POPULATION

SUMMARY: Nowadays, meat production is oriented to the quality of products due to consumer demand. Palability traits are the main criteria for choosing beef meat after hygienic and nutritional characteristics. The objective of this study was to analyze genetically the palability characteristics of two commercial cuts of different market price (sirloin and shin) in Avileña Negra Ibérica, and determine the existence of residual variance heterogeneity for those cuts. Samples of those commercial cuts were obtained from 400 calves and judged, after preparation, by 10 panelists. Results revealed the difference regarding the palability of the two cuts and suggest the existence of heterogeneous residual variance for all the traits except for the odor.

Keywords: *meat quality, palability traits, heterogeneity of variance.*

Tabla 1. Medias posteriores (desviaciones estándares) de la diferencia entre los dos cortes comerciales: morcillo (M) y solomillo (S) para los caracteres sensoriales.

Parámetro	Carácter					
	Olor	Color	Terneza	Jugosidad	Flavor	Aceptación
S - M	0.42 (0.05)	-0.38 (0.07)	2.19 (0.07)	1.41 (0.07)	1.29 (0.06)	1.38 (0.06)

Tabla 2. Medias posteriores (desviaciones estándares) de los parámetros estimados en los modelos homo y heterocedásticos para los caracteres sensoriales.

1	Parámetro					
	σ_u^2	σ_e^2		σ_p^2	h^2	
2		σ_{eM}^2	σ_{eS}^2		h_M^2	h_S^2
Olor	0.10 (0.02)	0.56 (0.04)		0.40 (0.05)	0.09(0.02)	
	0.10 (0.02)	0.60 (0.07)	0.53 (0.06)	0.40 (0.05)	0.09 (0.02)	0.10(0.02)
Color	0.11 (0.03)	0.95 (0.06)		0.43 (0.05)	0.07 (0.02)	
	0.11 (0.03)	0.89 (0.10)	1.01 (0.11)	0.43 (0.05)	0.08 (0.02)	0.07 (0.02)
Terneza	0.12 (0.03)	1.06 (0.06)		0.44 (0.06)	0.07 (0.02)	
	0.12 (0.03)	1.51 (0.01)	0.66 (0.09)	0.43 (0.05)	0.06 (0.01)	0.10 (0.02)
Jugosidad	0.12 (0.03)	1.23 (0.07)		0.47 (0.06)	0.07 (0.02)	
	0.12 (0.03)	0.88 (0.11)	1.63 (0.16)	0.47 (0.06)	0.08 (0.02)	0.06 (0.01)
Flavor	0.10 (0.02)	0.75 (0.05)		0.36 (0.05)	0.08 (0.02)	
	0.10 (0.02)	0.93 (0.10)	0.59 (0.07)	0.37 (0.04)	0.07 (0.02)	0.10 (0.02)
Aceptación	0.11 (0.03)	0.79 (0.05)		0.43 (0.05)	0.08 (0.02)	
	0.12 (0.03)	0.99 (0.11)	0.62 (0.08)	0.43 (0.05)	0.08 (0.02)	0.10 (0.02)

¹ y ² corresponden a las estimas de los parámetros de los modelos homo y heterocedástico, respectivamente.

Tabla 3. Comparación de modelos (bondad de ajuste y habilidad predictiva) de caracteres organolépticos.

Carácter	Criterios de comparación de modelos			
	Bondad de ajuste		Habilidad predictiva ^b	
	2 Log Bayes ^a	Factor de D (homocedástico)	D (heterocedástico)	
Olor	17.98	0.84	0.83	
Color	-3.42	1.33	1.33	
Terneza	-33.28	1.47	1.47	
Jugosidad	-33.66	1.70	1.69	
Flavor	-11.36	1.07	1.08	
Aceptación	-12.96	1.15	1.15	

^a Valores positivos indican un mejor ajuste para el modelo homocedástico; ^b Valores más pequeños indican mejor habilidad predictiva.

PARÁMETROS GENÉTICOS Y TENDENCIAS GENÉTICAS ASOCIADOS A CARACTERES PRODUCTIVOS Y DE APARIENCIA DEL VELLÓN EN ALPACAS

Cervantes, I. ^a, Goyache, F. ^b, Pérez-Cabal, M.A. ^a, Nieto, B. ^a, Salgado, C. ^a, Burgos, A. ^c
y Gutiérrez, J.P. ^a

^aDepartamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. Email: gutgar@vet.ucm.es.

^bSERIDA-Somió, C/ Camino de los Claveles 604, E-33203 Gijón (Asturias).

^cPACOMARCA S.A. P.O.BOX 94, Av. Parra 324, Arequipa, Perú.

INTRODUCCIÓN

Perú produce aproximadamente el 90% de la fibra procedente de camélidos suramericanos (CONACS, 2004). La especie más utilizada para este fin es la alpaca. Esta especie es vital para el mantenimiento de las comunidades rurales del área Andina. Existen dos grupos raciales de alpacas, la raza Suri (SU) y la Huacaya (HU) siendo esta última la más utilizada en la producción de fibra. La raza HU posee una fibra corta, rizada, densa y esponjosa que cubre casi todo su cuerpo dejando sólo su cara y parte distal de sus extremidades cubiertas con pelo corto, mientras que la fibra de la raza SU es lacia, sedosa, larga y brillante (Wuliji et al., 2000). Los intentos realizados para establecer un programa de mejora genética en esta especie han fracasado debido al infradesarrollo social de las zonas productoras. Una excepción es el esquema de mejora implantado por la empresa PACOMARCA S.A. desde 1992 sobre su propio rebaño, que actúa como núcleo de selección en las ganaderías de su entorno, y que dispone de un software de gestión propio. El objetivo de selección es el diámetro de la fibra (Gutiérrez et al., 2009). Sin embargo, por motivos de marketing, el criterio de selección utilizado en este rebaño hasta muy recientemente ha sido una combinación entre la apariencia del vellón y el diámetro de la fibra. La relación entre los caracteres subjetivos del vellón y el diámetro de la fibra no ha sido establecida hasta la fecha y, por lo tanto, la reducción del diámetro de la fibra por selección podría haber estado limitada por las actuaciones buscando mejorar la apariencia del vellón. El objetivo de este trabajo fue doble: la estimación de parámetros genéticos para caracteres relacionados con el diámetro de la fibra y caracteres de apariencia del vellón, y el estudio de las tendencias genéticas realizadas en el rebaño de PACOMARCA para esos caracteres.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado los datos del control de rendimientos de la ganadería de PACOMARCA S.A. sobre 9 caracteres, 4 de calidad de fibra (DF-diámetro de la fibra, CV-coeficiente de variación, SD-desviación típica y FCO-porcentaje de fibras inferior a 30 µm llamado factor de confort) y 5 valorados de forma subjetiva en una escala lineal de 1 a 5 (DEN-Densidad, RIZ-Rizado, CAB-cobertura de la cabeza, EXT-cobertura de las extremidades y AGE-aspecto general). Después de una somera depuración de los datos se dispuso de alrededor de 6940 registros de fibra de 3114 animales y alrededor de 2815 de apariencia del vellón. El archivo de pedigrí contaba con 3955 animales.

Se realizó una estimación REML multicarácter para los nueve caracteres de forma conjunta. La ecuación del modelo de análisis general fue $y = Xb + Zu + Wp + e$, representando y el vector de datos, b el vector de efectos fijos, u el vector de efectos genéticos aditivos, p el vector de ambientes permanentes y e el residuo, y X , Z y W las correspondientes matrices de incidencia de los efectos que acompañan. Las matrices de varianzas y covarianzas de los efectos aleatorios se consideró diagonal para todos los efectos excepto para el vector de efectos genéticos aditivos para la que fue proporcional a la matriz numerador de relaciones aditivas y todas las covarianzas entre efectos distintos fueron asumidas nulas. El efecto ambiental permanente no se incluyó en el modelo para el análisis de los caracteres subjetivos. Como efectos fijos para los caracteres de fibra se incluyeron el mes-año de esquila, el sexo y el efecto raza-color con tres niveles: HU blanco, HU color y SU, así como la edad a la esquila como covariable lineal y cuadrática. Para los caracteres subjetivos los efectos fijos fueron el año de nacimiento, el sexo, y la combinación raza-color. Un resumen

de la distribución de los datos se presenta en la tabla 1. Para la estimación se utilizó el programa VCE v.5.0 (Neumaier and Groeneveld, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estimaciones obtenidas para la heredabilidad y las correlaciones genéticas para todos los caracteres se presentan en la tabla 2. Todas las heredabilidades fueron moderadas (de 0,16 a 0,46), siendo las repetibilidades entre 0,44 y 0,59 para los caracteres de fibra. Las estimaciones de heredabilidades obtenidas en caracteres de fibra de camélidos suramericanos son muy escasas. Frank et al. (2006) en su revisión cita un amplio rango de 0,18 a 0,73 y Gutiérrez et al. (2009) en esta misma población cita una heredabilidad de 0,41 para el diámetro de la fibra. Todos los caracteres relacionados con el diámetro de la fibra y su variabilidad mostraron valores similares con elevadas correlaciones genéticas a excepción de la que existe entre el diámetro de la fibra y el coeficiente de variación, mostrando que la variabilidad respecto al valor medio resulta independiente de él. Los valores de heredabilidad para los caracteres subjetivos resultaron en valores de magnitud ligeramente inferior mostrando correlaciones genéticas entre ellos de -0,07 a 0,94, destacando la importancia de la cobertura de la cabeza en el aspecto general del vellón. No se conocen estimaciones de parámetros genéticos para los caracteres subjetivos del vellón medidos en escala lineal para camélidos suramericanos. Si se comparan con caracteres morfológicos medidos en otras especies, como por ejemplo en Asturiana de los Valles, los valores obtenidos van de 0,06 a 0,33 (Gutiérrez y Goyache, 2002), un rango similar al de las presentadas aquí. En cuanto a la correlación entre caracteres de apariencia subjetivos y de fibra, ninguna de las correlaciones presentó un valor superior a 0,41, mostrando así cierta independencia. En concreto, la correlación entre la densidad de la lana y el diámetro de la fibra es inexistente, contradiciendo de esta manera la selección realizada a favor de la apariencia densa del vellón. Las tendencias genéticas observadas representando el valor genético medio en función del año de nacimiento, revelan que la selección llevada a cabo desde la toma masiva de registros en 1996 se ha basado principalmente en caracteres subjetivos, descuidando el diámetro de la fibra, que incluso ha engrosado, hasta recientemente en que la tendencia ha permitido recuperar los valores genéticos medios existente en su fundación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONACS, 2004. Ministerio de Agricultura, Lima, Perú.
- Frank, E.N., Hick, M.V.H., Gauna, C.D., Lamas, H.E., Renieri, C. & Antonini, M., 2006. Small Rum. Res. 61:113–129.
- Gutierrez, J.P., & Goyache, F. 2002. J. Anim. Breed. Genet. 119:93-129
- Gutiérrez, J.P., Goyache, F., Burgos, A. & Cervantes, I. 2009. Livest. Sci., in press.
- Neumaier, A., Groeneveld, E., 1998. Genet. Sel. Evol. 30, 3-26.
- Wuliji, T., Davis, G.H., Dodds, K.G., Turner, P.R., Andrews, R.N. & Bruce, G.D., 2000. Small Rum. Res. 37:189–201.

Tabla 1. Número de datos (N) y de niveles para los 4 caracteres de fibra y los 5 de apariencia del vellón (subjetivos).

	N	Mes-Año/Año	Sexo	Raza-Color
Fibra	6936-6941	33 Mes-Año	2	3
Apariencia del vellón	2813-2816	16 Años	2	3

Tabla 2. Heredabilidad (diagonal) y correlaciones genéticas (sobre la diagonal) estimadas para todos los caracteres (DF-Diámetro, CV-Coeficiente de Variación, SD-Desviación estándar, FCO-Factor de Confort, DEN-Densidad, RIZ-Rizado, CAB-Cabeza, EXT-Extremidades, AGE-General).

	DF	SD	FCO	CV	DEN	RIZ	CAB	EXT	AGE
DF	0,428	0,774	-0,974	0,135	0,001	-0,250	-0,201	0,068	-0,080
SD		0,459	-0,826	0,725	-0,125	-0,410	-0,064	0,132	-0,017
FCO			0,306	-0,239	-0,009	0,284	0,156	-0,105	0,046
CV				0,369	-0,212	-0,395	0,124	0,151	0,070
DEN					0,221	0,704	0,226	-0,073	0,234
RIZ						0,339	0,345	0,087	0,367
CAB							0,379	0,757	0,942
EXT								0,418	0,809
AGE									0,158

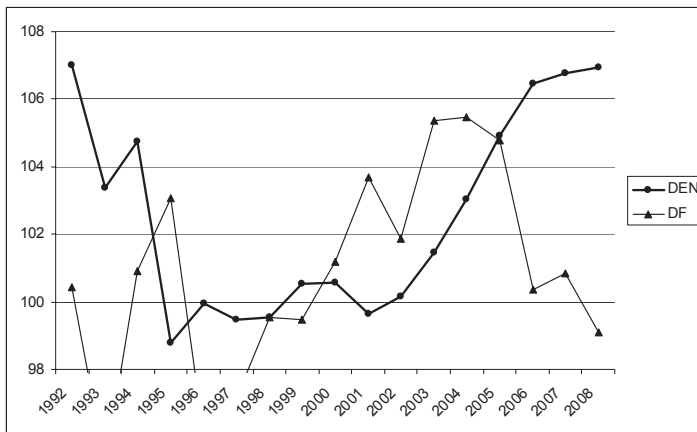


Figura 1. Tendencias genéticas de los caracteres diámetro de fibra (DF) y el carácter subjetivo densidad del vellón (DEN) en la alpaca.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por un contrato de investigación entre PACOMARCA S.A. y el grupo de investigación nº 920332 “Modelos de selección y evaluación de reproductores” de la Universidad Complutense de Madrid.

GENETIC PARAMETERS AND GENETIC TRENDS IN FIBRE AND SUBJECTIVE FLEECE TRAITS IN PERUVIAN ALPACAS

ABSTRACT: A total of 6940 records of fibre traits (fibre diameter, standard deviation, coefficient of variation and comfort factor) and 2815 records of subjective fleece traits (density, curling, head, limbs and general appearance) obtained from Peruvian alpacas exploited by PACOMARCA S.A. were analysed. Multivariate animal models were fitted to estimate variance components under REML using VCE v.5.0 program.

The estimated heritabilities ranged from 0.16 to 0.46, and the repeatabilities for fibre traits were from 0.44 to 0.59. Genetic correlations between subjective fleece and objective fibre traits were lower than 0.41. Genetic correlation between density and fibre diameter was basically null. Genetic trends observed by year of birth reveal that selection has been carried out using subjective traits. Fibre diameter genetic mean value has decreased only very recently.

Keywords: heritability, fibre traits, genetic correlations, alpaca

INTERACCIONES Gx_E Y HETEROGENIDAD GENÉTICA ENTRE LACTACIONES EN LA OVEJA CHURRA

Sánchez, J. P.¹, de la Fuente, L. F., Carriedo, J. A. y San Primitivo, F.
Dep. Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071 León, España.
¹jpsans@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de ganado ovino de razas autóctonas en general, y de la raza Churra en particular, presentan una gran variabilidad, pudiendo encontrar explotaciones con muy distinto grado de intensificación productiva y reproductiva (El-Saied et al., 2006). El actual esquema de selección de esta raza (De la Fuente et al., 1995) no contempla la interacción que pudiera haber entre esta amplia variación ambiental y los efectos genéticos. Y las estimaciones de parámetros genéticos obtenidos para esta población son considerablemente más bajas (El-Saied et al., 2006), que las que se obtienen para otras poblaciones (p.e. Lacaune (Barillet y Boichard, 1987)) que, en general, presentan una mayor uniformidad en sus sistemas de producción. Por otra parte, pudiera existir heterogeneidad genética entre las distintas lactaciones de un animal, que de alguna manera pudiera interpretarse como otra evidencia de interacciones Gx_E.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el ganado Churro la magnitud de las interacciones Gx_E es considerable y que ésta a su vez estas interacciones pueden ser diferentes para cada lactación. El objetivo de este trabajo es precisamente estimar el valor de los parámetros genéticos para producción de leche en la oveja Churra, considerando las interacciones Gx_E y una posible heterogeneidad genética entre lactaciones.

MATERIAL Y METODOS

La base de datos analizada incluyó 77.251 registros de controles lecheros diarios, producidos por 7.998 ovejas en 2.127 grupos de contemporáneas (GC) (Rebaño-Día de control, RDC) (56 rebaños). El Pedigree asociado a ella incluyó 17.450 registros. En este Pedigree, los padres desconocidos y los machos de monta natural se reemplazaron por grupos genéticos (47), definidos por la concatenación del año de nacimiento y el sexo (madre o padre desconocido). Las observaciones se tipificaron a media cero y desviación típica 1.

Durante la edición de la base de datos únicamente se seleccionaron registros de hembras hijas de machos de IA, con al menos tres controles por lactación. Para reducir la proporción de GC pequeños, se descartaron todos los datos de ovejas que tuvieron algún registro en una clase de RDC con menos de 10 controles.

La definición de las variables ambientales a considerar en los modelos con interacción Gx_E se hizo utilizando las estimaciones del efecto RDC de modelos hijos.

En un primer grupo de análisis, se han empleado modelos univariados (UF) y multivariados (MF) fijos, para estimar el efecto de los niveles del factor Rebaño-Día de control. En un segundo grupo de análisis, se han empleado modelos animales univariados (UAR) y multivariados de repetibilidad (MAR), para estimar la heredabilidad en la situación en que no se asume heterogeneidad entre lactaciones y para estimar las heredabilidades y correlaciones genéticas entre ellas. Finalmente, los modelos UAR y MAR se extendieron a modelos de regresión aleatoria, al considerar como covariable ambiental las medias de los RDC y así investigar la variabilidad en las normas de reacción a esta variable ambiental (RR-UAR y RR-MAR) (Kolmodin et al., 2002).

En todos estos modelos, los factores fijos considerados fueron: Rebaño-Día de control (RDC); número de nacidos vivos (NV) en el parto que inicia la lactación; ordinal de control (OC); periodo de lactación en semanas (SIM); y ordinal de parto (OP) y edad de la oveja el día del parto, como una covariable anidada al ordinal de parto (EDAD(OP)). Así el efecto de los factores fijos para un registro en concreto (h) quedaría definido de la siguiente manera:

$$\mathbf{x}'_h \boldsymbol{\beta} = RDC_i + OP_j + EDAD(OP)_j + NV_k + OC_i + SIM_m$$

Donde $\boldsymbol{\beta}$ son los efectos de los distintos niveles y \mathbf{x}'_h el vector de diseño para el registro h -ésimo. En los casos multivariados, como para todos los caracteres (1, 2 y ≥ 3 parto) se asume el mismo modelo, bastaría con incluir un subíndice (t) en todos los términos de esta ecuación.

A continuación se presentan las ecuaciones de todos estos modelos, así como la estructura de (co)varianzas para los efectos aleatorios del modelo más complejo (RR-MAR). El subíndice p se refiere a la oveja p -ésima.

$$\text{UF: } y_h = \mathbf{x}'_h \boldsymbol{\beta} + e_h; \quad \text{MF: } y_{ih} = \mathbf{x}'_{ih} \boldsymbol{\beta} + e_{ih}$$

$$\text{UAR: } y_h = \mathbf{x}'_h \boldsymbol{\beta} + a_p + p_p + e_h; \quad \text{MAR: } y_{ih} = \mathbf{x}'_{ih} \boldsymbol{\beta} + a_{ip} + p_{ip} + e_{ih}$$

$$\text{RR-UAR: } y_h = \mathbf{x}'_h \boldsymbol{\beta} + a_p + \hat{R}DC_i \times a_{s_p} + p_p + \hat{R}DC_i \times p_{s_p} + e_h$$

$$\text{RR-MAR: } y_{ih} = \mathbf{x}'_{ih} \boldsymbol{\beta} + a_{ip} + \hat{R}DC_{ii} \times a_{s_{ip}} + p_{ip} + \hat{R}DC_{ii} \times p_{s_{ip}} + e_{ih}$$

$$\mathbf{a}^{*'} = \{\mathbf{a}', \mathbf{a}_s'\}; \quad \mathbf{p}^{*'} = \{\mathbf{p}', \mathbf{p}_s'\} \quad \text{y} \quad \text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{a}^* \\ \mathbf{p}^* \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{G}_0 \otimes \mathbf{A} & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{P}_0 \otimes \mathbf{I} & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{R}_0 \otimes \mathbf{I} \end{bmatrix}$$

\mathbf{G}_0 y \mathbf{P}_0 son matrices simétricas de (co)varianzas de dimensión 6×6 y \mathbf{R}_0 es una matriz de (co)varianzas de dimensión 3×3 . \mathbf{A} es la matriz del doble de las relaciones de parentesco.

La estimación de los componentes de varianza se realizó usando el algoritmo EM-REML implementado en el programa *remlf90* (Misztal, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados de ajuste de los 4 modelos mixtos investigados. Los p -valores de las pruebas de cocientes de verosimilitud, correspondientes a los estadísticos y grados de libertad mostrados son cero, por lo tanto no podemos rechazar las hipótesis de heterogeneidad entre partos e interacción GxE.

La tabla 2 muestra las estimaciones de parámetros genéticos para los modelos que no consideran la interacción GxE (UAR y MAR). Como se ha indicado en estudios previos (Cappelletti, 1998), la heredabilidad disminuye con el número de parto, y las correlaciones genéticas, si bien son altas, siempre son inferiores a 0.9. A pesar de esta evidencia debería valorarse, para nuestros parámetros, en qué grado el modelo de repetibilidad es una buena aproximación del modelo multicarácter, para predecir un único valor genético.

En la figura 1 se presentan las estimaciones de heredabilidad como una función de la escala ambiental, calculadas usando los modelos RR-UAR y RR-MAR. Igualmente en esta figura se muestran los patrones de cambio de las correlaciones genéticas entre el ambiente promedio (0) y el resto de situaciones ambientales. Se puede apreciar que el efecto de la interacción es más acusado en el primer parto que en el resto, de forma que se observan mayores fluctuaciones en la heredabilidad y en la correlación genética. Además, el modelo de repetibilidad (RR-UAR) conduce a un patrón de heredabilidad cuyos valores son menores que los observados para los distintos partos de manera individualizada.

Nuestros resultados indican que existe heterogeneidad genética entre lactaciones para la producción lechera; y que la interacción GxE, considerada mediante modelos de norma de reacción, muestra una magnitud significativa. Ambos factores incluidos en los modelos de evaluación genética pudieran conducir, a estimas más precisas del valor genético, al poder hacer la evaluación dependiente del ambiente de producción. Lo que en consecuencia, con respecto al sistema de evaluación actual incrementaría la respuesta esperada a la selección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barillet, F. & Boichard, D., 1987. Genet. Sel. Evol. 19:459–474.
- Cappelletti, C. A. 1998. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- De la Fuente, L.F., Baro, J.A. & San Primitivo, F. 1995. *Cahiers OPTIONS méditerranéennes*. vol. 11: 165-172.
- El-Saied, U.M., de la Fuente, L.F. & San Primitivo, F. 2006. *Livest. Sci.*, 101: 180-190.
- Kolmodin, R., Strandberg, E., Madsen, P., Jensen, J. & Jorjani, H. 2002. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* 52: 11-24.
- Misztal, I. 2002. <http://nce.ads.uga.edu/~ignacy/numpub/blupf90/docs/remlf90.pdf>.

Tabla 1. Estadísticos de ajuste y grados de libertad de los distintos modelos investigados

	g.l.	-2log(L)	AIC
UAR	75,026	156,606.5	156,612.5
RR-UAR	75,022	154,356.9	154,374.9
MAR	71,455	107,382.3	107,436.3
RR-MAR	71,425	104,460.7	104,622.7

g.l.: 77,251 - rango(X) modelo fijo – (nº Grupos Genéticos - 1) – nº Comp. Varianza

Tabla 2. Estimaciones de heredabilidad (diagonal y primera columna) y correlaciones genéticas entre partos (triangular superior)

UAR	MAR		
h ²	1 Lact.	2 Lact.	>=3 Lact.
0.126	0.1619	0.896	0.870
		0.1526	0.865
			0.1055

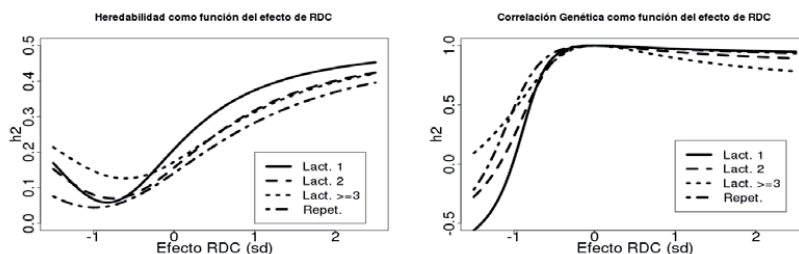


Figura 1. Heredabilidades y correlaciones genéticas como función de la escala ambiental.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado como parte del proyecto GR-43/2008 financiado por la Junta de Castilla y León.

GxE INTERACTIONS AND GENETIC HETEROGENEITY ACROSS LACTATIONS IN CHURRA SHEEP

ABSTRACT: The objective of this study is to assess heterogeneity across lactations and GxE interactions for daily milk production in Churra sheep. To this end, 77,251 test day records were fitted using univariate and multivariate reaction norm models. Heritability estimates across lactations range from 0.16 to 0.10 and the genetic correlations between them were lower than 0.9. Substantial genetic variation was observed in reaction norms to the environmental scale (defined by the average production of Contemporary Groups). The heritability in the first lactation changed from 0.09 in the average environment (0) to more than 0.35 in the best environments (+2 standard deviations (sd)) and negative genetic correlations (-0.45) were observed between performances in the average environment and at -1.3 sd below this average environment. Our results, although preliminarily, suggest that these sources of variation could be important and should be considered in the evaluation models.

Keywords: dairy sheep, milk production, GxE interaction, heterogeneity across lactations.

BÚSQUEDA DE UN GEN DE GRAN EFECTO PARA PROLIFICIDAD EN LA RAZA MANCHEGA

Cano-Ortiz, P.¹, Ramón, M.^{1,3}, Jurado, J.J.², Serrano, M.², Pérez-Guzmán, M.D.¹

¹CERSYRA, Av. del Vino 10. 13300 Valdepeñas. Ciudad Real. pcanoo@jccm.es.

²INIA. Dpto. de Mejora Genética Animal, Ctra. La Coruña km 7.5, 28049 Madrid.

³UCLM, ETSIA, Av. España s/n, 02071 Albacete.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la producción de leche se constituye como el único objetivo del actual programa de mejora de la Raza Manchega. No obstante, existen otros caracteres cuya importancia económica ha sido descrita (Legarra et al., 2007) y que podrían resultar de interés como nuevos objetivos de selección. Uno de estos caracteres es la prolificidad, cuya importancia económica se ve respaldada por la IGP "Cordero Manchego". La heredabilidad del carácter prolificidad es baja (Espinosa y Jurado, 1998) y el progreso genético esperable de un programa de selección sería muy lento. Sin embargo, en diversas razas de ovino se ha identificado la presencia de genes con efecto mayor para prolificidad (Davis, 2005) por lo que una selección a favor de estos genes permitiría un importante incremento del número de corderos nacidos en muy poco tiempo. Investigaciones recientes llevadas a cabo en la raza Rasa Aragonesa han concluido con el hallazgo de una mutación en el gen BMP15 (FecX^R), causante de un incremento en la prolificidad de 0.3243±0.0448 corderos por oveja y parto (Martínez-Royo et al., 2008; Jurado et al., 2008). La presencia de estos genes en diversas razas ovinas nos ha llevado a pensar que también pueda existir en la Raza Manchega. Así, el objetivo del presente trabajo es el estudio de la prolificidad en la raza ovina Manchega para la detección de los posibles individuos con prolificidades especialmente elevadas en contraste con el resto de la población.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado los datos de 658.427 lactaciones distribuidas en 270 rebaños de ovino manchego. En la Tabla 1 se muestra un resumen de los datos.

Tabla 1. Descriptivos para el estudio de la prolificidad en raza ovina Manchega.

	Resultado
No. Lactaciones	658.427
No. Rebaños con datos de partos	270
No. Animales	277.826
No. Animales con padre y madre conocidos	57.119
No. Animales con padre y madre desconocidos	152.575
No. Ovejas con madre conocida	123.175
No. Ovejas que son madres	72.403
No. De partos medio por oveja	2.45 ± 1.72
No. Medio de hijas por macho	39.65
Prolificidad media	1.45 ± 0.56

A partir de estos datos, se realizó una valoración genética para el carácter prolificidad mediante metodología BLUP, usando un modelo animal con medidas repetidas para el carácter número de corderos vivos en un parto (Espinosa y Jurado, 1996). La ecuación del modelo utilizado fue la siguiente:

$$y_{ijkmp} = \mu + RAE_i + LE_j + IP_k + a_m + \varepsilon_p + \varepsilon_{ijkmp}$$

donde: y_{ijkmp} es la prolificidad de la oveja m en el parto p
 μ es la media global de la población
 RAE_i es el efecto de la interacción rebaño-año-estación de parto (9886 niveles)

LE_j es el efecto de la interacción número de parto y edad de la oveja al parto (114 niveles)

IP_k es el intervalo entre partos consecutivos de la oveja (4 niveles: primer parto, <90 días, entre 90 y 160 días y >160 días)

a_m es el valor genético para prolificidad de la oveja m

ε_p es el efecto permanente del parto p en la oveja n

ε_{ijkmp} es el efecto residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la valoración genética de prolificidad se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la valoración genética para prolificidad.

	Resultado
Varianza genética	$0.010 \pm 0.693 \cdot 10^{-3}$
Varianza ambiente permanente	$0.009 \pm 0.557 \cdot 10^{-3}$
Varianza Residual	$0.312 \pm 0.656 \cdot 10^{-3}$
Heredabilidad	0.03
Repetibilidad	0.05

La Figura 1 muestra el progreso genético para el carácter prolificidad en machos y hembras por separado, y dentro de estas últimas en función de que su padre sea o no conocido. Para los machos se observó un incremento anual progresivo, existiendo determinados años en los cuales el incremento fue importante. En el caso de las hembras con padre conocido se observa una tendencia casi constante y superior a las hembras con padre desconocido, diferencia que se incrementa en los últimos años debido a un aumento considerable en prolificidad de las hembras con padre conocido.

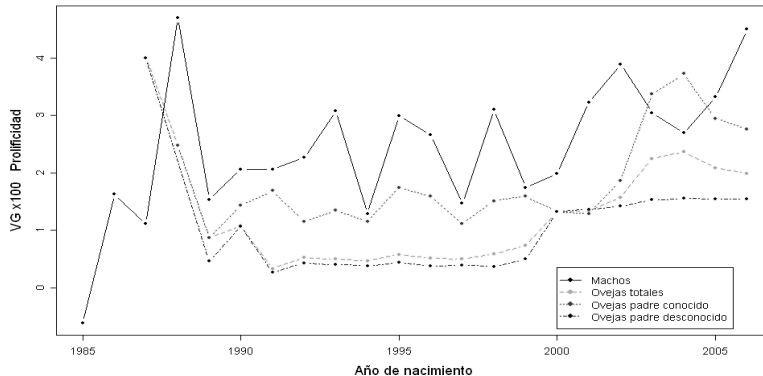


Figura 1. Progreso genético para prolificidad en machos y hembras de raza Manchega.

Dentro del progreso genético para prolificidad en los machos destacan dos momentos: el aumento del valor genético medio observado en el año 1988 con respecto al año anterior y el aumento producido en los años 2001 y 2002 y que va acompañado de un importante incremento del valor genético medio de las hembras de padre conocido. Así, se decidió buscar entre los machos nacidos en esos años los posibles candidatos a portar un gen con efecto mayor sobre la prolificidad.

En la Tabla 3 se muestra a tres de los sementales que presentan mayor valor genético en la población estudiada, encontrándose muy por encima de la media de la población (VG medio = +1.32). Asimismo, se presenta a un hermano del Macho 3 (VG = +29), el Macho 4, con una prolificidad media de 1.42 corderos/parto y un valor genético VG = -1. Resulta llamativo que tengan valores genéticos y prolificidades tan diferentes.

Tabla 3. Relación de sementales con información genética y fenotípica de la prolificidad de sus hijas.[†]

MACHO	VG	INFORMACIÓN HIJAS				PORCENTAJE PARTOS			
		NH	NC	NP	PROL	S	D	T	C
MACHO1	35	145	634	404	1.57	45.8	52.0	1.7	0.5
MACHO2	26	103	455	286	1.60	44.6	51.2	4.2	0
MACHO3	29	38	175	116	1.51	53.4	42.2	4.3	0
MACHO4	-1	39	163	115	1.42	60.9	36.5	2.6	0
TOTAL		275693		2.45	1.45	56.0	38.9	2.3	2.8

[†] NH: número de hijas; NC: número de corderos; NP: número de partos; VG: valor genético. Porcentaje de partos: S (simples), D (dobles), T (triples) y C (cuatro o más corderos por parto).

La distribución de partos de los Machos 1, 2 y 3 difiere claramente del resto, con frecuencias de partos múltiples mucho mayores que las observadas en el resto de la población. Los VGs de estos 3 sementales (de +29 a +36) resultaron bastante mayores comparados con el resto de la población (VG medio = +1.32).

Estos datos nos hacen pensar que verdaderamente pueda existir un factor genético que afecta a la prolificidad de la oveja Manchega, hecho que nos conduce a poner en práctica las pruebas oportunas, basadas en el trabajo realizado sobre la Rasa Aragonesa (Martínez-Royo et al., 2008), sin perder de vistas los resultados obtenidos en otras razas como la Lacaune (Bodin y col.2007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Martínez-Royo, A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A., Fantova, E., Bodin, L., Mulsant, P., Serrano, M., Folch, J. & Calvo, J.H. 2008. Anim. Gen. 39(3):294-7
- Jurado, J.J., Martínez-Royo, A. & Calvo, J.H. 2008. ITEA Vol. 104 (2).
- Legarra A., Ramón M., Ugarte, E. & Pérez-Guzmán MD. 2007. Animal. Vol 1(2):193-203.
- Espinosa, M.J. & Jurado, J.J. 1998. ITEA 92A:297-304.
- Davis, G.H. 2005. Genet Sel Evol. 37 Suppl 1:S11-23.
- Jurado, J.J. & Espinosa, M.J. 1996. ITEA 92A:44-56.
- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L. & Mulsant, P. 2007. Endocrinology Vol.148, 1 393-400.

Agradecimientos: Agradecemos a la asociación de ganado Manchego AGRAMA su colaboración. Pilar Cano agradece a la JCCM la concesión de una beca predoctoral.

LOOKING FOR A MAJOR GENE FOR PROLIFICACY IN MANCHEGA SHEEP BREED

ABSTRACT: Nowadays, milk yield improvement is the main aim of the Manchega sheep breeding program. However, some other traits with a known economic value could be of interest. Prolificacy, defined as number of lambs born, is one of these traits and its interest on Manchega breed is due to that production is supported by a geographical indication (GI) that increase its value. Although, heritability of prolificacy is low ($h^2=0.03$) and expected genetic progress would be low also, in some sheep breeds a gene with a major effect on prolificacy has been described allowing a considerable improvement if a selection program on these genes was established. The objective of this work was the study of the genetic progress for prolificacy in Manchega sheep looking for some animals that could be carriers of a major gene for prolificacy. Once candidate animals were found, a future study to search for the presence of a major gene on these animals will be carried out.

Keywords: sheep, prolificacy, major gene, Manchega.

PARÁMETROS GENÉTICOS DEL SEMEN DESCONGELADO DE CONEJO. RESULTADOS PRELIMINARES.

Lavara R., Mocé E., García M.L., Vicente J.S. y Baselga M.
ICTA, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n
Valencia. rlavara@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la mayoría de las inseminaciones en cunicultura, se realizan con semen refrigerado a falta de un procedimiento de congelación eficaz. El semen congelado podría aportar en un futuro una mejor gestión de los machos y centros de inseminación y, una mayor seguridad biológica de las muestras seminales (Mocé y Vicente, 2009), ya que podrían almacenarse las pajuelas durante el tiempo necesario en bancos de nitrógeno para poder realizar las pruebas serológicas y bacteriológicas pertinentes.

El objetivo del estudio es estimar el determinismo genético del semen congelado de una línea paternal de conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras: Se utilizaron para el estudio 1660 eyaculados de un total de 315 machos adultos pertenecientes a una línea paternal de conejos seleccionada durante 25 generaciones por velocidad de crecimiento durante el periodo de engorde. Todos los eyaculados fueron recuperados mediante el uso de una vagina artificial, el ritmo de recuperación fue de dos eyaculados por semana con un intervalo de tiempo entre recuperaciones de 20 minutos. Los machos estaban alojados en 3 núcleos de selección-multiplicación pertenecientes a la red UPV, situados en las provincias de Valencia y Murcia. De cada uno de los eyaculados se analizaron los daños en el acrosoma y el porcentaje de motilidad individual con la ayuda de un software específico para el análisis de la motilidad espermática (Sperm Class Analyzer, S.C.A., Microptic, Barcelona, España). Para ello, una vez recuperado el eyaculado y realizado un primer análisis macroscópico, con el objetivo de eliminar aquellos eyaculados que presentaban una apariencia anómala (coloración diferente de blanco-nacarado, o presencia de precipitados), se procedió a la fijación de una primera muestra de 50 µl de semen con 950 µl de glutaraldehído al 0,25% para determinar los daños en acrosomas, y una segunda muestra de 50 µl de semen con 950 µl de diluyente de semen de conejo para determinar el porcentaje de motilidad.

Posteriormente a la toma de muestras, se congeló cada uno de los eyaculados basándose en el procedimiento descrito por Mocé et al. (2003) con ligeras modificaciones. En este trabajo preliminar se han descongelado un total de 680 pajuelas. De cada una de las pajuelas descongeladas se tomaron los datos de normalidad acrosómica y porcentaje de motilidad individual mediante el procedimiento descrito anteriormente para la valoración de semen fresco. Además se analizó el porcentaje de espermatozoides vivos tras la descongelación mediante el uso de citometría de flujo.

Variables analizadas:

Se analizaron 5 variables dependientes: motilidad del semen fresco, motilidad del semen descongelado, normalidad acrosómica del semen fresco, normalidad acrosómica del semen descongelado y el porcentaje de espermatozoides vivos tras la descongelación. Para normalizar los datos se procedió a la transformación arcoseno de las variables motilidad en fresco y descongelado y normalidad acrosómica en fresco y descongelado.

Análisis estadísticos:

Se utilizó un modelo animal bivalente para las variables motilidad y normalidad acrosómica en fresco y descongelado. Mientras que para la variable porcentaje de vivos tras la descongelación se utilizó un modelo univariante. El modelo mixto utilizado para todas las variables seminales propuestas fue el siguiente:

$$y_{ijhokmn} = \mu + S_i + O_j + N_h + P_o + a_k + p_m + e_{ijhokmn}$$

donde $y_{ijhokmn}$ es la variable seminal, S_i es el efecto sistemático año estación con 64 niveles, O_j es el efecto sistemático orden de eyaculado con 2 niveles (primero o segundo eyaculado), N_h es el efecto sistemático núcleo de selección con 3 niveles, P_o es el efecto sistemático

edad del macho (6 meses, 6-8 meses, 8 meses), a_k es el valor genético aditivo del macho, p_m es el efecto aleatorio permanente del macho k sobre todos sus eyaculados, y $e_{ijhokmn}$ es el residual.

Las componentes de varianza y covarianza fueron estimadas utilizando el programa informático TM desarrollado por Legarra et al. (2008), para hallar las soluciones REML de las componentes de varianza. Para los modelos bivariantes se realizaron un total de 800.000 iteraciones con un periodo de quemado de 30000 iteraciones, y para el univariante se realizaron un total de 200.000 iteraciones con un periodo de quemado de 10.000. Se tomó una muestra de cada 100 iteraciones, para evitar la alta correlación entre muestras consecutivas. La convergencia se comprobó para cada cadena separadamente usando el criterio Z de Geweke.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de las distribuciones marginales posteriores estimadas de la h^2 , de los efectos p^2 , de las correlaciones genéticas y los efectos permanentes entre los caracteres frescos y descongelados, para los caracteres seminales estudiados se muestran en las Tablas 1 y 2. Las distribuciones marginales posteriores tuvieron un error de Monte Carlo pequeño y el test Z de Geweke no detectó falta de convergencia (resultados no mostrados en tablas).

Las estimas de h^2 para los caracteres en fresco son diferentes de cero, mostrando el porcentaje de normalidad acrosómica una h^2 intermedia ($0,239 \pm 0,085$; Tabla 1), sin embargo, los caracteres del semen descongelado no muestran la misma pauta ya que únicamente el porcentaje de vivos tras la descongelación muestra una h^2 media ($0,208 \pm 0,077$; Tabla 1). Los resultados obtenidos para el porcentaje de normalidad acrosómica y de motilidad individual en fresco son semejantes a los observados anteriormente para la misma línea, utilizando un modelo animal bivalente para el carácter seminal y la ganancia diaria de peso entre los 28 y los 53 días de vida ($0,247 \pm 0,069$, y $0,156 \pm 0,041$, para la NAR% y la MOT% respectivamente, Lavara et al., 2008a, Lavara et al., 2008b), pero inferiores a los obtenidos por otros autores en diferentes especies como por ejemplo porcino, donde las h^2 del porcentaje de motilidad se sitúan entre 0,38-0,44 (Smítal et al., 2005, Oh et al., 2003). De los resultados obtenidos para las características del semen descongelado, se puede observar que las estimas de los efectos p^2 son superiores a las estimas de la h^2 (Tabla 1). La motilidad en las muestras de semen descongelado muestra una h^2 no diferente de cero y similar a la obtenida por Furstoss et al. (2009) en cabras ($0,03 \pm 0,02$ y $0,05 \pm 0,03$ para las razas Saanen y Alpina, respectivamente). Cabe destacar que el porcentaje de espermatozoides vivos muestra una repetibilidad cercana al 0,5 (Tabla 1). Por otro lado, los caracteres porcentaje de motilidad en fresco y descongelado, presentan una correlación entre efectos permanentes elevada ($0,770 \pm 0,253$; Tabla 2). Del resto de correlaciones genéticas y permanentes, su interés y su precisión se reducen conforme las heredabilidades o los efectos permanentes se aproximan a cero (Tabla 1 y Tabla 2).

CONCLUSIONES

En nuestro experimento, la motilidad y normalidad acrosómica del semen descongelado de conejo presentan heredabilidades próximas a cero, sin embargo el porcentaje de espermatozoides vivos tras la descongelación, presenta una heredabilidad intermedia y una repetibilidad cercana al 0,5.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Furstoss, V., David, I., Leboeuf, B., Guillouet, P., Boué, P. & Bodin, L. 2009. Anim Rep Sci 110: 25-36.
- Lavara, R., García, M.L., Torres, C., Vicente, J.S. & Baselga, M. 2008a. 9th World Rabbit Congress 425-429.
- Lavara, R., García, M.L., Torres, C., Vicente, J.S. & Baselga, M. 2008b. 9th World Rabbit Congress 430-434.
- Legarra, A., Varona, L. & López de Maturana, E. 2008. <http://cat.toulouse.inra.fr/~alegarra>
- Mocé, E., Vicente, J.S. & Lavara, R. 2003. Theriogenology 60: 115-123
- Mocé, E. & Vicente, J.S. 2009. Anim Rep Sci. 110: 1-

Tabla 1. Análisis descriptivos de las características seminales. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de la heredabilidad (h^2) y de los efectos permanentes no aditivos (p^2) con sus desviaciones estándar para las características seminales.

	MOT(%)	MOTD(%)	NAR(%)	NARD(%)	VIVOSD(%)
Media	61,93	10,83	87,62	13,94	18,48
Desviación	27,43	12,42	15,98	17,34	12,29
h^2	0,121±0,046	0,062±0,037	0,239±0,085	0,067±0,039	0,208±0,077
p^2	0,113±0,044	0,126±0,046	0,181±0,075	0,070±0,036	0,257±0,067

MOT (%): porcentaje de espermatozoides móviles en fresco MOTD(%): porcentaje de espermatozoides móviles en descongelado; NAR (%): porcentaje de acrosomas no dañados del semen fresco; NARD(%): porcentaje de acrosomas no dañados del semen descongelado; VIVOSD(%): porcentaje de espermatozoides vivos del semen descongelado.

Tabla 2. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las correlaciones genéticas (rg) y de los efectos permanentes (rp) con sus desviaciones estándar para los caracteres en fresco y descongelado.

	MOT-MOTD	NAR-NARD
rg	0,507±0,446	-0,456±0,379
rp	0,770±0,253	0,693±0,274

MOT (%): porcentaje de espermatozoides móviles totales en fresco MOTD(%): porcentaje de espermatozoides móviles totales en descongelado; NAR (%): porcentaje de acrosomas no dañados del semen fresco; NARD(%): porcentaje de acrosomas no dañados del semen descongelado;

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por los proyectos (CICYT AGL2004-02710/GAN y AGL2008-03274), y con una beca F.P.U. para R. Lavara (Ministerio de Ciencia e Innovación).

GENETIC PARAMETERS OF CRYOPRESERVED RABBIT SPERM. PRELIMINARY RESULTS

ABSTRACT: The objective of this study was to estimate the genetic parameters of frozen-thawed sperm from a rabbit line selected for increased growth rate in the fattening period during 25 generations. The traits studied were: percentage of spermatozoa with normal apical rigide in fresh and cryopreserved semen [NAR (%), NARD (%)], total motile sperm in fresh and cryopreserved semen [MOT (%), MOTD (%)], and percentage of live sperm in cryopreserved semen [LIVED(%)]. Equal model equations for all semen traits included the artificial insemination station, the period, the year-season and the order of ejaculate as fixed effects; the animal, the permanent environmental and non-additive genetic effect of the male, and the residual as random effects.

Estimates of heritability, permanent effect and genetic correlation between fresh and cryopreserved sperm characteristic were obtained from the solutions of a bivariate animal model. In cryopreserved sperm, estimates of the permanent effect were higher than estimates of heritability. The heritabilities for MOTD and NARD were not different from zero, but LIVED showed an intermediate heritability (0.208±0.077). The genetic correlations between fresh and cryopreserved semen characteristics were not different from zero, but high permanent environmental and non-additive correlation was observed between MOT and MOTD (0.770±0.253).

Keywords: genetic parameters, fresh sperm, rabbit, frozen-thawed sperm.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS CARACTERES DE FERTILIDAD Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN LA HEMBRA DE CONEJO

Tusell¹, LL., Rafel, O., Ramon, J. y Piles, M.

¹Unitat de Cunicultura IRTA. Torre Marimón s/n. 08140 Caldes de Montbui. Barcelona. llibertat.tusell@irta.cat

INTRODUCCIÓN

En las líneas terminales de conejo en las que los caracteres de crecimiento son objeto de selección, es de especial interés determinar que tipo de relación guardan estas variables con los caracteres reproductivos con la finalidad de evitar un posible deterioramiento de la aptitud reproductiva. En éste estudio se pretende analizar la relación genética existente entre la velocidad de crecimiento medio (ADG) y la fertilidad de la hembra (F).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y datos

Los animales procedían de la línea Caldes seleccionada masalmente por ADG durante el periodo de engorde, y se encontraban en una granja experimental situada en Caldes de Montbui (Barcelona). Esta cuenta con aislamiento y medidas de control de temperatura. Machos y hembras iniciaban su periodo reproductivo a los 5 y 4.5 meses de edad, respectivamente, y estaban sometidos a un régimen de iluminación de 16h luz/día. Las hembras seguían un ritmo reproductivo semi-intensivo, siendo el intervalo entre partos de 42 días. A los 28 días de vida los gazapos eran destetados y alojados en grupos de 8 con alimentación *ad limitum* durante 32 días. Los datos corresponden al periodo comprendido entre Noviembre de 1983 y Octubre de 2008. Hasta Junio de 2003 se realizaba monta natural, posteriormente y hasta la finalización del estudio, se procedió al uso de la IA, utilizando tratamiento hormonal en las hembras para la inducción del estro y posterior ovulación.

Los caracteres analizados fueron F, definida como éxito a fracaso a la cubrición, del que se dispusieron de 27,234 datos procedentes de 7,895 hembras y ADG durante el periodo de engorde, utilizándose 114,135 datos de todos los individuos desde el inicio de la selección. El pedigrí incluía 114,485 animales.

Modelo y análisis estadístico

Ambos caracteres se analizaron conjuntamente mediante un modelo mixto longitudinal umbral-gaussiano.

Se utilizó el siguiente modelo para la velocidad de crecimiento:

$$y_{adg} = \mathbf{X}_{adg} \boldsymbol{\beta}_{adg} + \mathbf{Z}_{1,adg} \mathbf{u}_{adg} + \mathbf{Z}_{2,adg} \mathbf{p}_{adg} + \mathbf{Z}_{3,adg} \mathbf{c}_{adg} + \mathbf{e}_{adg}$$

Donde $\boldsymbol{\beta}_{adg}$ es el vector de efectos sistemáticos, \mathbf{u}_{adg} es el vector de efectos genéticos aditivos, \mathbf{p}_{adg} y \mathbf{c}_{adg} son los vectores de efectos permanentes de tipo ambiental maternos y de camada de origen, respectivamente, y \mathbf{e}_{adg} es el vector de residuos aleatorios. \mathbf{X}_{adg} , $\mathbf{Z}_{1,adg}$, $\mathbf{Z}_{2,adg}$ y $\mathbf{Z}_{3,adg}$ son matrices de incidencia que relacionan los datos con los efectos sistemáticos, genéticos y ambientales de tipo permanente, respectivamente. Los efectos sistemáticos incluidos en el modelo fueron: año-estación, orden de parto en el que nació el individuo y número de nacidos vivos de la camada a la que pertenece.

Para la variable subyacente (*l*) de fertilidad se utilizó un modelo mixto en el que el residuo se descompuso en dos términos \mathbf{c}_f y \mathbf{e}_f , siendo el primero de tipo permanente ambiental relacionado con el efecto de camada de origen de la velocidad de crecimiento, lo que permitía una mayor conexión entre los datos y a su vez, estimar la posible correlación de tipo ambiental entre los dos caracteres.

Así pues el modelo para la variable subyacente fue: $\mathbf{l}_f = \mathbf{X}_f \boldsymbol{\beta}_f + \mathbf{Z}_{1,f} \mathbf{u}_f + \mathbf{Z}_{2,f} \mathbf{p}_f + \mathbf{Z}_{3,f} \mathbf{c}_f + \mathbf{e}_f$

Donde $\boldsymbol{\beta}_f$ es el vector de efectos sistemáticos, \mathbf{u}_f es el vector de efectos genéticos aditivos de hembra, \mathbf{p}_f es el vector de efectos permanentes de tipo ambiental y genético no aditivo de hembra y, \mathbf{c}_f y \mathbf{e}_f son los dos vectores en los que se descomponía el vector de residuos. \mathbf{X}_f , $\mathbf{Z}_{1,f}$, $\mathbf{Z}_{2,f}$ y $\mathbf{Z}_{3,f}$ son matrices de incidencia que relacionan la variable subyacente con los efectos sistemáticos, genéticos y ambientales de tipo permanente, respectivamente. Los efectos sistemáticos incluidos en el modelo fueron: estado fisiológico de la hembra (nulpára, múltipara lactante y múltipara no lactante en el momento de la cubrición) y año-estación.

La distribución de las observaciones condicionada a los parámetros del modelo fue la siguiente:

$$p(\mathbf{y} | \boldsymbol{\beta}, \mathbf{u}, \mathbf{p}, \mathbf{c}, \mathbf{R}) \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_1\mathbf{u} + \mathbf{Z}_2\mathbf{p} + \mathbf{Z}_3\mathbf{c}, \mathbf{I} \otimes \mathbf{R})$$

donde $\mathbf{y}' = (\mathbf{y}'_f, \mathbf{y}'_{adg})$; $\boldsymbol{\beta}' = (\boldsymbol{\beta}'_f, \boldsymbol{\beta}'_{adg})$; $\mathbf{u}' = (\mathbf{u}'_f, \mathbf{u}'_{adg})$; $\mathbf{p}' = (\mathbf{p}'_f, \mathbf{p}'_{adg})$ y $\mathbf{c}' = (\mathbf{c}'_f, \mathbf{c}'_{adg})$ se descomponen en los vectores de efectos sistemáticos y aleatorios descritos anteriormente para los dos caracteres, \mathbf{I} es una matriz identidad y \mathbf{R} es la matriz de (co)varianzas residuales con la siguiente estructura:

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

Se consideraron las siguientes distribuciones a priori de los parámetros:

$$p(\boldsymbol{\beta}) \sim U(-5,5), p(\mathbf{u} | \mathbf{G}) \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{A} \otimes \mathbf{G}), p(\mathbf{p} | \mathbf{P}) \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I} \otimes \mathbf{P}), p(\mathbf{c} | \mathbf{C}) \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I} \otimes \mathbf{C})$$

Donde \mathbf{A} es la matriz de relaciones de parentesco y $\mathbf{G} = \begin{bmatrix} \sigma_{u:f}^2 & \sigma_{u:f,adg} \\ \sigma_{u:f,adg} & \sigma_{u:adg}^2 \end{bmatrix}$;

$\mathbf{P} = \begin{bmatrix} \sigma_{p:f}^2 & \sigma_{p:f,adg} \\ \sigma_{p:f,adg} & \sigma_{p:adg}^2 \end{bmatrix}$ y $\mathbf{C} = \begin{bmatrix} \sigma_{c:f}^2 & \sigma_{c:f,adg} \\ \sigma_{c:f,adg} & \sigma_{c:adg}^2 \end{bmatrix}$ son las matrices de (co)varianzas los de

efectos genéticos y ambientales de tipo permanente descritos anteriormente. Se asignaron priors uniformes acotados a los elementos de las matrices \mathbf{G} , \mathbf{P} y \mathbf{C} . Se utilizó el algoritmo de muestreo de Gibbs para aproximar las distribuciones marginales posteriores de los parámetros de interés. Se obtuvo una cadena de 500,000 iteraciones, desechándose las primeras 100,000 y se guardó 1 de cada 10 muestras. La varianza de muestreo de las cadenas fue obtenida calculando el error de Monte Carlo (Geyer *et al.*, 1992). Los estadísticos de las distribuciones marginales posteriores se calcularon directamente de las muestras guardadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra los estadísticos descriptivos de las distribuciones marginales posteriores estimadas de los ratios entre los componentes de variación y las correlaciones obtenidas entre ambos caracteres para los distintos efectos aleatorios.

La h^2 de la F fue similar a la obtenida en la misma línea en estudios anteriores (Piles *et al.*, 2005) y la h^2 del ADG se encuentra dentro del rango de heredabilidades encontrado en distintas líneas de conejos (Larzul y Gondret, 2005) y en esta misma línea (Piles *et al.*, 2004). La correlación genética entre F y la ADG resultó ser baja y negativa con elevada probabilidad ($P < 0.088$). No existe información previa publicada de la relación entre fertilidad y caracteres de crecimiento en especies prolíficas. Sin embargo, la elevada correlación entre la fertilidad del macho y el tamaño de camada (0.97 p.s.d. 0.05) del macho de ésta misma línea (Tusell *et al.*, 2008), permiten relacionar estos resultados con los obtenidos en otros estudios en los que se estima la correlación entre crecimiento y el tamaño de camada atribuido a la hembra. En dichos trabajos, se observan correlaciones negativas, nulas o positivas, pero siempre de baja magnitud (García y Baselga 2002, Bünger *et al.*, 2005).

En conclusión, aunque en éste estudio F y ADG están correlacionados negativamente, la magnitud de esta relación no parece lo suficientemente importante como para esperar que la aptitud reproductiva de las hembras de líneas seleccionadas por crecimiento pueda verse comprometida en el transcurso del proceso de selección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bünger, L., Lewis, R., Rothschild, M., Blasco, A., Renne, U., & Simm, G. 2005. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 1489-1502.
- García, M.L. & Baselga, M. 2002. *Livest. Prod. Sci* 78, 91-98.
- Geyer, C.J. 1992. *Stat. Sci.* 7: 473-511.
- Larzul, C. & Gondret, F. 2005. *INRA, Prod. Anim.* 18(2), 119-129.
- Piles, M., Gómez, E.A., Rafel, O., Ramon, J. & Blasco, A. 2004. *J. Anim. Sci.* 82:654-660.
- Piles, M., Rafel, O., Ramon, J. & Varona L. 2005. *J. Anim. Sci.* 83:340-

343. • Sorensen, D. S., Andersen, S., Gianola, D. & Korsgaard, I. 1995. *Genet. Sel. Evol.* 27:229-249. • Tusell, LL., Rekaya, R., López-Bejar, M., García-Tomás, M., Rafel, O., Ramon J., & Piles, M. submitted to 2009 Joint Meeting of ADSA, CSAS, and ASAS. Title: Genetic association between male fertility and prolificacy after artificial insemination with semen subjected to limited screening.

Tabla 1. Media posterior (PM), intervalo mínimo de máxima densidad al 95%(HPD95%), error de Monte Carlo (MCse) y correlación entre muestras consecutivas (Lag) de los parámetros del modelo para velocidad de crecimiento (ADG) y fertilidad (F).

ADG				
Parámetro	PM	HPD95%	MCse	Lag
h^{2a}	0.1431	0.1215 , 0.1640	0.0010	0.9520
ρ^b	0.0239	0.0163 , 0.0313	0.0002	0.8715
c^c	0.2777	0.2680 , 0.2870	0.0002	0.4364
σ^{2d}	51.5393	50.8210 , 52.3110	0.0213	0.4742
F				
Parámetro	PM	HPD95%	MCse	Lag
h^{2a}	0.0413	0.0165 , 0.0701	0.0017	0.9939
ρ^b	0.1400	0.1077 , 0.1738	0.0001	0.9408
e^e	0.8187	0.7926 , 0.8452	0.0006	0.9015
σ^{2d}	6.8987	4.4720 - 9.1105	0.1238	0.9880
Parámetro	PM	HPD95%	MCse	Lag
rg^f	-0.1205	-0.3030 , 0.0681	0.0111	0.9855
rp^g	0.4738	0.2827 , 0.6666	0.0049	0.9182
re^h	0.2147	0.0998 , 0.3339	0.0043	0.9551
rf^i	0.1108	0.0515 , 0.1657	0.0023	0.9569

^a h^2 : heredabilidad; ^b ρ : ratio de variación debida al efecto permanente de hembra; ^c c : ratio de variación debida al efecto de camada de origen; ^d σ^2 : varianza fenotípica; ^e e : ratio de variación residual; ^f rg : correlación genética; ^g rp : correlación del efecto permanente de hembra; ^h re : correlación residual; ⁱ rf : correlación fenotípica.

Agradecimientos: Proyecto financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA-RTA2005-0008-C02) y una beca predoctoral INIA para LI. Tusell.

GENETIC ANALYSIS OF FERTILITY AND AVERAGE DAILY GAIN IN RABBIT DAM

ABSTRACT: A Bayesian bivariate Linear-Threshold Animal Model was performed to determine the genetic correlation between doe fertility (F) and average daily gain (ADG) in a rabbit line selected for growth rate during the fattening period. The model used for ADG included the systematic effects of year-season, parity order and number of kids born alive, the animal additive effect, the maternal genetic plus permanent environmental effects and the environmental permanent effect of litter and the random residual effect. The model for the underlying variable for F included the systematic effects of year-season and physiological status of the female, the female additive genetic effects, the female non additive genetic plus permanent environmental effects and the residual, which was divided in an environmental permanent effect related with the environmental permanent effect of litter for ADG, and a random residual term. The obtained heritabilities were 0.04 and 0.14 for F and ADG, respectively. The genetic correlation was low and negative (-0.12) with a probability of 88% of being lower than 0. Thus, the negative value of the genetic correlation seems not to be enough to consider that female reproductive performance is being affected by the selection for growth traits in rabbit lines.

Keywords: Fertility, Growth, Correlation, Rabbit

MODELO RECURSIVO CON PUNTOS DE CAMBIO. UNA APLICACIÓN AL TAMAÑO DE CAMADA Y EL NÚMERO DE LECHONES NACIDOS MUERTOS

Ibáñez- Escriche, N^{1.}, López de Maturana, E^{2.}, Noguera, J.L.¹ y Varona, L.³

¹Genética i Millora Animal, IRTA-Lleida, 25198 Lleida

²Dpto. de Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid

³Dpto. de Anatomía, Embriología y Genética Animal, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza.

Noelia.ibanez@irta.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el interés por el estudio de las relaciones entre caracteres productivos a nivel fenotípico, en el contexto de la genética cuantitativa, ha aumentado gracias a la publicación del trabajo de Gianola y Sorensen (2004). En este trabajo, se describen los procedimientos estadísticos para la resolución de estos modelos de ecuaciones estructurales que tienen una larga tradición en el ámbito de las ciencias sociales.

Recientemente, López de Maturana et al. (2009) han extendido la aplicación de estos modelos recursivos a relaciones no lineales entre fenotipos, a través de una regresión segmentada. Esta aproximación permitió determinar la existencia de correlaciones heterogéneas tanto entre efectos genéticos, como entre permanentes y entre los residuos. Sin embargo, presenta dos desventajas: la predeterminación de los puntos de cambio, que definen la no linealidad, y la discontinuidad en dichos puntos de cambio. El objetivo de este trabajo es proponer un modelo recursivo que permita estimar estos puntos de cambio, y describir una aplicación, en el estudio de la relación no lineal entre el tamaño de camada (número total de lechones nacidos) y el número de lechones nacidos muertos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Animal

Los individuos de la población analizada pertenecían a un núcleo de selección, de raza *Large White*, seleccionado por tamaño de camada. Los datos analizados corresponden al número total de lechones nacidos (TC) y al número de lechones nacidos muertos (NM) de 4.462 partos producidos por 1070 cerdas y registrados durante el período 1999-2006.

Análisis estadístico

En el análisis se estudiaron los posibles efectos recursivos del tamaño de camada sobre el número de lechones nacidos muertos. Para analizar la posible relación no lineal entre estos caracteres, se utilizó un modelo recursivo con coeficientes estructurales heterogéneos. Tras un análisis exploratorio, se consideró la necesidad de estimar dos puntos de cambio, que distinguen tres grupos de TC.

Asumiendo una distribución conjunta normal multivariante para TC y NM, los datos de un individuo i perteneciente al grupo k fue modelizado como

$$\Lambda_k \mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i \mathbf{b} + \mathbf{Z}_i \mathbf{a} + \mathbf{W}_i \mathbf{p} + \mathbf{e}_i, \quad (1)$$

donde

$$\mathbf{y}_i | \Lambda_k, \mathbf{T}_m, \mathbf{b}, \mathbf{a}, \mathbf{p}, \mathbf{R}_0 \sim (\Lambda_k^{-1} (\mathbf{X}_i \mathbf{b} + \mathbf{Z}_i \mathbf{a} + \mathbf{W}_i \mathbf{p}), \Lambda_k^{-1} \mathbf{R}_0 \Lambda_k^{-1}). \quad (2)$$

En este caso, Λ_k ($k=1,2,3$) es la matriz estructural de coeficientes correspondiente al subgrupo k de tamaño de camada, con la forma

$$\Lambda_k = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\lambda_{NM \leftarrow TC} & 1 \end{bmatrix} \quad (3)$$

\mathbf{T}_m es el vector de puntos de cambio y m es el número de puntos de cambio. En nuestro caso $m=2$ por lo que $\Lambda_k = \Lambda_1$ si $y_{TC_i} \leq T_1$, $\Lambda_k = \Lambda_2$ si $T_1 < y_{TC_i} \leq T_2$ y $\Lambda_k = \Lambda_3$ si $y_{TC_i} > T_2$.

En la ecuación 2, \mathbf{y}_i es un vector 3×1 que contiene los datos de los caracteres TC y NM; \mathbf{b} es el vector de los efectos sistemáticos (orden de parto, 6 niveles, y la combinación entre el año y la estación, con 31 niveles); \mathbf{a} es el vector de los efectos genéticos aditivos (1534); \mathbf{p} es el vector de los efectos permanentes (1070); y \mathbf{e} es el vector de los efectos residuales. \mathbf{X}_i , \mathbf{Z}_i , \mathbf{W}_i son matrices de incidencia conocida.

Implementación de MCMC y su análisis posterior.

Para simplificar llamamos $\theta = \Lambda_k, \mathbf{T}_m, \mathbf{b}, \mathbf{a}, \mathbf{p}, \mathbf{G}_0, \mathbf{P}_0, \mathbf{R}_0$, por lo que la densidad posterior conjunta de θ y de NM viene dada por

$$p(\mathbf{y}_{NM}, \theta | \mathbf{y}_{TC}) \propto p(\mathbf{y}_{NM}, \mathbf{y}_{TC}, \theta) = p(\mathbf{y}_{NM}, \mathbf{y}_{TC} | \theta) \times p(\theta).$$

Donde, $p(\theta) = p(\Lambda_k | \mathbf{T}_m) p(\mathbf{T}_m) p(\mathbf{b}) p(\mathbf{a} | \mathbf{G}_0) p(\mathbf{G}_0) p(\mathbf{p} | \mathbf{G}_{0p}) p(\mathbf{P}_0) p(\mathbf{R}_0)$.

Como distribuciones *a priori*, se asignaron normales multivariantes para $\lambda_k \sim N(\mathbf{0}, I\sigma_\lambda^2)$, donde $k=1,2$, y $\sigma_\lambda^2=100$; $\mathbf{b} \sim N(\mathbf{0}, I\sigma_\beta^2)$, con $\sigma_\beta^2=100$; efectos permanentes, $\mathbf{p} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{P}_0 \otimes \mathbf{I})$; y efectos aditivos, $\mathbf{a} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{G}_0 \otimes \mathbf{A})$. Mientras a los puntos de cambio \mathbf{T}_m se les asignó una distribución *a priori* uniforme $\mathbf{T} \sim Unif[y_{TC\min}, y_{TC\max}]$. Se asumió *a priori* que los parámetros de dispersión se distribuyen siguiendo *Wishart* invertidas con 4 grados de libertad. Para evitar problemas de identificación de parámetros, se asumieron que los errores de los caracteres no estaban correlacionados, por lo que \mathbf{R}_0 se asumió diagonal. La inferencia de los parámetros se realizó aplicando el algoritmo de *Gibbs*, excepto en el caso de los puntos de cambio \mathbf{T}_m cuya distribución posterior no es conocida y se muestreó con *Metropolis Hasting*.

Para que los parámetros de los modelos recursivos puedan ser interpretables, como en los modelos mixtos estándar, las matrices de (co)varianza (\mathbf{G}_0 , \mathbf{P}_0 and \mathbf{R}_0) necesitan ser ajustadas por la matriz estructural de coeficientes Λ_k :

$$\mathbf{G}_k^* = \Lambda_k^{-1} \mathbf{G}_0 \Lambda_k^{-1}, \mathbf{P}_k^* = \Lambda_k^{-1} \mathbf{P}_0 \Lambda_k^{-1}, \mathbf{R}_k^* = \Lambda_k^{-1} \mathbf{R}_0 \Lambda_k^{-1} \text{ (Sorensen y Gianola 2002).}$$

Después de varios análisis exploratorios se utilizó una cadena de 100.000 iteraciones, con un periodo de “quemado” de 1.000 iteraciones. Cada 10 iteraciones se tomó una muestra, para evitar la alta correlación entre muestras consecutivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de las distribuciones marginales posteriores estimadas de los puntos de cambio, coeficientes estructurales, varianzas, correlaciones y heredabilidades se presentan en las Tablas 1 y 2. Las distribuciones marginales posteriores tuvieron un error de Monte Carlo pequeño y el test de Geweke (Geweke 1992) no detectó falta de convergencia (resultados no mostrados). Como se puede observar en la Tabla 1, los intervalos mínimos de máxima densidad al 95% (IMD95%) de los puntos de cambio y los coeficientes estructurales difieren claramente entre si. Además, los IMD95% de los coeficientes estructurales no contienen el cero. Estos resultados confirmarían la relación no lineal entre TC y NM e indicarían que el número de lechones muertos al parto se incrementa un 0,13, 0,16, y 0,21 en cada subgrupo, respectivamente, por cada lechón nacido adicional.

La media posterior de la heredabilidad para TC fue de 0.09 con un IMD95% de 0.04-0.13, similar a lo publicado por Noguera et al., (2002). A excepción de la correlación del error, la distribución posterior de la heredabilidad para NM y las de las correlaciones genéticas y permanentes entre TC y NM fueron similares para los tres subgrupos (ver tabla 2). Las medias posteriores de las heredabilidades fueron bajas y las correlaciones genéticas y

permanentes cercanas a cero, coincidiendo con los resultados publicados por Ibáñez-Escriche et al. (2009) con un modelo mixto estándar.

Los resultados obtenidos en este análisis mostrarían la utilidad de los modelos recursivos con coeficientes estructurales heterogéneos y estimación de puntos de cambio. No obstante, sería interesante realizar una comparación de modelos con diferente número de puntos de cambio a través de una validación cruzada de los datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Geweke, J. 1992. Bayesian Statistics 4, 169-193.
- Gianola, D. & Sorensen, D. 2004. Genetics 167: 1407-1424.
- Ibáñez-Escriche, N., Varona, L., Quintanilla, R., Casellas, J. & Noguera, J.L. 2009. J. Anim. Sci. 2009.87:80-87.
- López de Maturana, E., X.-L. Wu, D. Gianola, K. A., Weigel & G. J. M., Rosa. 2009. Genetics 181:277-287.
- Noguera, J.L., Varona, L., Babot, D. & Estany, J. 2002. J. Anim. Sci. 80: 2548-2555.

Tabla 1. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de los puntos de cambio (T) y los coeficientes estructurales (λ).

	T_1	T_2	λ_1	λ_2	λ_3
Media	15,30	19,71	0,13	0,16	0,21
IMD95%	14,94 -16,20	17,15 - 21,20	0,13 - 0,14	0,15 - 0,17	0,18 - 0,26

IMD: Intervalo mínimo de máxima densidad al 95%.

Tabla 2. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de la heredabilidad de los lechones nacidos muertos y de las correlaciones entre tamaño de camada y lechones nacidos muertos para cada subgrupo del tamaño de camada.

	Grupos de NT					
	(λ_1)		(λ_2)		(λ_3)	
	Media	IMD95%	Media	IMD95%	Media	IMD95%
h^2_{NM}	0,07	0,02 - 0,13	0,07	0,02 - 0,12	0,07	0,02 - 0,12
$\rho_{gTC, gNM}$	-0,02	-0,25 - 0,24	0,01	-0,22 - 0,27	0,07	-0,18 - 0,33
$\rho_{pTC, pNM}$	0,14	-0,08 - 0,37	0,16	-0,07 - 0,39	0,21	-0,02 - 0,46
$\rho_{eTC, eNM}$	1,40	1,23 - 1,54	1,65	1,50 - 1,79	2,21	1,77 - 2,66

IMD: Intervalo mínimo de máxima densidad al 95%. h^2_{NM} : heredabilidad de los lechones nacidos muertos. ρ_g

TC, gNM : $\rho_{pTC, pNM}$ y $\rho_{eTC, eNM}$ correlación genética, permanente y del error entre TC y NM, respectivamente.

A CHANGE-POINT RECURSIVE MODEL. AN APPLICATION TO DATA OF LITTER SIZE AND PIGLETS BORN DEAD.

ABSTRACT: The emergence of statistical methods for the analysis of relationships between phenotypes in a quantitative genetics scenario, stimulated several studies analyzing recursive relationships in the animal breeding and genetics context. Only one of those studies has analyzed nonlinear relationships between phenotypes, through the implementation of a segmented regression. However, this approach assumed fixed change points, with loss of analysis flexibility. A change-point recursive model and its application in litter size (LS) and number of piglets born dead (NBD) is presented in this paper. Field data were provided by a Large White selection nucleus of a commercial breeding company. Field data contained litter size and number of born dead piglets from 4462 farrows. The results revealed the existence of at least 2 change points and different structural coefficients between the change points. These would indicate a non linear relationship between LS and NBD and it would support the change-point recursive model. Nevertheless, a model comparison with different number of change points would be interesting.

Keywords: Recursive model, non linearity relationship, change-points, prolificacy.

CORRELACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA ENTRE ASIMETRÍA FLUCTUANTE, INMOVILIDAD MUSCULAR Y COCIENTE DE LEUCOCITOS EN GALLINAS

Campo, J.L., Dávila, S.G., M.G. Gil y Muñoz, I.

Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria, Apartado 8111, 28080 Madrid; jicampo@inia.es

INTRODUCCIÓN

La asimetría fluctuante es el índice más recomendado de estabilidad durante el desarrollo (Palmer y Strobeck, 1992) y se considera un indicador del estrés genético o ambiental (Parsons, 1992), utilizándose como medida del bienestar y de la aptitud biológica de un animal (Tuytens, 2003). La relación entre asimetría fluctuante, duración de inmovilidad muscular (Gallup, 1979), y cociente de leucocitos (Gross y Siegel, 1983) ha sido estudiada a nivel fenotípico. Moller et al. (1999) indicaron que la asimetría fluctuante para longitud de pata estaba positivamente correlacionada con la duración de la inmovilidad muscular (0.24^*) en pollos sometidos a estrés de luz, aunque ninguna de las estimas indicadas por Moller et al. (1995) era significativa en pollos sometidos a estrés de densidad de población (de 0.16 a 0.40). Similarmente, Mignon-Grasteau et al. (1993) no encontraron correlación significativa entre asimetría fluctuante y duración de la inmovilidad muscular en codornices, y Campo et al. (2000, 2002) tampoco encontraron correlaciones significativas entre asimetría fluctuante, inmovilidad muscular y cociente de leucocitos en gallinas. Yalcin et al. (2003) indicaron que la asimetría fluctuante no estaba correlacionada con la duración de la inmovilidad muscular ni con el cociente de leucocitos en pollos de carne. El objetivo de este estudio fue estimar por máxima verosimilitud restringida la correlación genética y fenotípica entre asimetría fluctuante, duración de la inmovilidad muscular, y cociente de leucocitos en gallinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una raza sintética de gallinas (Castellana Codorniz), originada a partir del cruce F_2 entre la Castellana Negra y la Prat Leonada (Campo, 1991). Se usaron 1.073 aves (358 machos y 715 hembras), pertenecientes a dos generaciones consecutivas (236 y 837 aves, respectivamente) con genealogía completa, para estimar la correlación entre la asimetría fluctuante, la duración de la inmovilidad muscular y el cociente de leucocitos a las 36 semanas de edad. Las aves no fueron estresadas deliberadamente.

Se midieron cinco caracteres bilaterales, tres morfológicos (longitud de pata, ala y segunda pluma primaria) y dos sexuales secundarios (área de orejilla y barbilla). Los valores del lado derecho (D) e izquierdo (I) se tomaron en la misma sesión. La asimetría fluctuante se definió por el valor absoluto de la diferencia entre lados $[|D-I|]$ y la asimetría relativa dividiendo el valor absoluto por la media del carácter $[2|D-I|/(D+I)]$. Se siguió el protocolo experimental indicado por Knierim et al. (2007) para identificar la asimetría como fluctuante y separarla del error de medida (Campo et al., 2005). La asimetría relativa no tenía distribución normal y se hizo la transformación arco seno raíz cuadrada. La inmovilidad muscular fue inducida colocando el animal sobre el dorso y con la cabeza colgando en una cuna de madera en forma de U (Jones y Faure, 1981), usando la transformación logarítmica antes del análisis. Para obtener el cociente de leucocitos (heterófilos:linfocitos) se siguió el método indicado por Lucas y Jamroz (1961), y se hizo la transformación raíz cuadrada.

Se utilizó un modelo mixto multivariado (Henderson y Quaas, 1976), el método indirecto de Misztal y Gianola (1987), el algoritmo libre de derivadas de Graser et al. (1987), y los paquetes PEST y VCE (Groeneveld et al., 1990; Groeneveld, 1994) para estimar los componentes de varianza-covarianza genética aditiva por máxima verosimilitud restringida (REML).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto la heredabilidad de la inmovilidad muscular como la del cociente de leucocitos fueron bajas (0.06 ± 0.02 y 0.13 ± 0.03 , respectivamente). La heredabilidad de la asimetría fluctuante no difería significativamente de cero, variando entre 0.00 y 0.06 (Campo et al., 2005).

Tabla 1. Correlación genética y fenotípica (paréntesis) entre asimetría fluctuante e inmovilidad muscular

Carácter	$\text{arc sen } [2 D-I /(D+I)]^{0.5}$	$ D-I $	$ D-I ^{0.5}$	$\log D-I $	$(D^2+I^2)-0.5(D+I)^2$	$ \ln D-\ln I $	$\log D-\log I$
Longitud de pata	0.39 (-0.03)	0.99*** (-0.03)	0.97*** (-0.02)	0.04 (0.01)	-0.12 (-0.02)	-0.30 (0.00)	-0.08 (0.00)
Longitud de ala	0.35 (-0.02)	0.21 (-0.04)	0.95*** (-0.03)	0.99*** (-0.02)	-0.26 (-0.04)	-0.12 (0.00)	0.29 (0.03)
Longitud de pluma	-0.29 (0.01)	-0.98*** (0.01)	-0.99*** (-0.06)	-0.98*** (-0.01)	-0.94*** (0.02)	-0.90*** (0.00)	-0.95*** (0.02)
Area de orejilla	0.98*** (0.00)	0.99*** (0.03)	0.97*** (-0.01)	0.88*** (-0.02)	-0.21 (0.08)	0.99*** (0.01)	-0.18 (-0.02)
Area de barbilla	0.99*** (0.01)	0.95*** (0.03)	0.98*** (-0.10)	0.97*** (0.05)	0.99*** (0.03)	0.99*** (0.00)	0.91*** (0.00)

Se encontró una correlación genética positiva entre la asimetría relativa de área de orejilla y área de barbilla, y la inmovilidad muscular (Tabla 1), así como entre la asimetría relativa media y la inmovilidad muscular (0.99***), mientras que la correlación fenotípica fue casi cero para los cinco caracteres y la asimetría relativa media (-0.03). Además de la asimetría relativa se utilizó la asimetría absoluta, $|D-I|$, dos valores transformados, $|D-I|^{0.5}$, $\log|D-I|$, y tres índices alternativos, $(D^2+I^2)-0.5(D+I)^2$, $|\ln D-\ln I|$, $\log D-\log I$. Aunque la asimetría absoluta tiene una distribución $\frac{1}{2}$ normal, los dos valores transformados se distribuyen normalmente. La correlación genética entre estos seis valores y la inmovilidad muscular estaba muchas veces cerca de +1 o de -1, incluyendo la de la asimetría absoluta media (0.99***), mientras que la correlación fenotípica estaba siempre cerca de cero (0.02 la de la asimetría absoluta media).

Tabla 2. Correlación genética y fenotípica (paréntesis) entre asimetría fluctuante y cociente leucocitos

Carácter	$\text{arc sen } [2 D-I /(D+I)]^{0.5}$	$ D-I $	$ D-I ^{0.5}$	$\log D-I $	$(D^2+I^2)-0.5(D+I)^2$	$ \ln D-\ln I $	$\log D-\log I$
Longitud de pata	0.25 (0.03)	0.13 (-0.01)	0.18 (-0.01)	0.13 (0.02)	0.03 (-0.01)	0.05 (0.00)	-0.12 (0.01)
Longitud de ala	-0.06 (-0.03)	-0.20 (-0.09)	-0.29 (-0.02)	-0.02 (0.00)	-0.24 (-0.03)	-0.21 (-0.04)	0.38 (0.05)
Longitud de pluma	-0.99*** (-0.01)	-0.90*** (-0.02)	-0.97*** (0.01)	-0.96*** (-0.01)	-0.90*** (0.01)	-0.99*** (0.01)	-0.98*** (0.02)
Area de orejilla	0.98*** (0.00)	0.99*** (-0.02)	0.98*** (-0.02)	0.63*** (-0.01)	0.99*** (0.05)	0.99*** (0.00)	0.99*** (-0.02)
Area de barbilla	-0.99*** (-0.03)	-0.14 (-0.04)	-0.10 (-0.04)	-0.97*** (-0.03)	-0.90*** (-0.02)	-0.90*** (-0.05)	-0.31 (0.03)

Aunque la correlación genética fue positiva entre asimetría relativa de área de orejilla y cociente de leucocitos, la de longitud de pluma y área de barbilla fue negativa (Tabla 2). La correlación genética entre la asimetría relativa media y el cociente de leucocitos fue 0.89***. La correlación fenotípica fue de nuevo casi cero para los cinco caracteres y la asimetría relativa media (-0.02). La correlación genética entre los dos valores transformados, los tres índices alternativos, y el

cociente de leucocitos estaba muchas veces cerca de +1 o de -1 (0.91*** la de la asimetría absoluta media), mientras que la correlación fenotípica estaba siempre cerca de cero (-0.02 la de la asimetría absoluta media).

La correlación fenotípica concuerda con las estimas encontradas en estudios previos (Mignon-Grasteau et al., 1993; Yalcin et al., 1993; Moller et al., 1995; Campo et al., 2000, 2002). La correlación genética entre asimetría fluctuante e inmovilidad muscular tendía a ser positiva, mientras que entre asimetría fluctuante y cociente de leucocitos variaba entre +1 y -1, aunque en ambos casos la correlación con la asimetría media estaba cerca de +1. La correlación fenotípica entre asimetría fluctuante, inmovilidad muscular y cociente de leucocitos era siempre cero, por lo que la correlación genética no reflejaba la correlación fenotípica. Puesto que la correlación genética (r_{12}^G) y la ambiental (r_{12}^E) se combinan para dar la correlación fenotípica $\{r_{12}^P = h_1 h_2 r_{12}^G + [(1-h_1^2)(1-h_2^2)]^{0.5} r_{12}^E\}$, si ambos caracteres tienen baja heredabilidad (h_1^2, h_2^2), la correlación fenotípica está determinada principalmente por la ambiental. La heredabilidad era baja en todos los casos y la correlación ambiental (entre -0.04 y 0.00) no difería de cero como la fenotípica. La gran diferencia entre la correlación genética y la ambiental indica que estas fuentes de variación afectan a los distintos indicadores de estrés a través de diferentes mecanismos fisiológicos.

La correlación genética entre inmovilidad muscular y cociente de leucocitos fue negativa (-0.46***), siendo la correlación fenotípica no diferente de cero (-0.01). Los estudios previos de correlación fenotípica indican valores de cero (Beuving et al., 1989; Yalcin et al., 2003) o negativos (Campo y Redondo, 1996, 1997; Mahboub et al., 2004).

En conclusión, las correlaciones fenotípicas encontradas sugieren que la asimetría fluctuante no está asociada con la duración de la inmovilidad muscular o el cociente de leucocitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beuving et al. 1989. Br. Poult. Sci. 30, 175-184.
- Campo, 1991. Poult. Sci. 70, 1469-1473.
- Campo & Redondo, 1996. Poult. Sci. 75, 155-159.
- Campo & Redondo, 1997. 5th Europ. Symp. Poult. Welf., Wageningen, 163-164.
- Campo et al. 2000. Poult. Sci. 79, 453-459.
- Campo et al. 2002. Europ. Poult. Sci. 66, 85-89.
- Campo et al. 2005. Poult. Sci. 84, 1689-1697.
- Gallup, 1979. Anim. Behav. 27, 316-317.
- Graser et al. 1987. J. Anim. Sci. 64, 1362-1370.
- Groeneveld, 1994. 5th World Congr. Genet. Appl. Liv. Prod., Guelph, 47-48.
- Groeneveld et al. 1990. 4th World Congr. Genet. Appl. Liv. Prod., Edinburgh, 488-491.
- Gross & Siegel, 1983. Avian. Dis. 27, 972-979.
- Henderson & Quaas, 1976. J. Anim. Sci. 43, 1188-1197.
- Jones & Faure, 1981. Behav. Proc. 6, 47-55.
- Knierim et al. 2007. Physiol. Behav. 92:398-421.
- Lucas & Jamroz, 1961. Atlas of Avian Hematology. USDA, Washington, DC.
- Mahboub et al. 2004. Br. Poult. Sci. 45, 738-744.
- Mignon-Grasteau et al. (1993). Behav. Proc. 61, 69-75.
- Misztal & Gianola, 1987. J. Dairy Sci. 70, 716-723.
- Moller et al. 1995. Poult. Sci. 74, 1761-1771.
- Moller et al. 1999. Appl. Anim. Behav. Sci. 62, 57-71.
- Palmer & Strobeck, 1992. Acta Zool. Fenn. 191, 57-72.
- Parsons, 1992. Heredity 68, 361-364.
- Tuytens, 2003. Anim. Welf. 12, 535-540.
- Yalcin et al. 2003. J. Appl. Poult. Res. 12, 382-388.

GENETIC AND PHENOTYPIC CORRELATION BETWEEN FLUCTUATING ASYMMETRY, TONIC IMMOBILITY AND LEUKOCYTE RATIO IN CHICKENS

ABSTRACT: The estimated genetic relationship between the combined relative asymmetry of all traits and tonic immobility or leukocyte ratio was near to +1; no significant phenotypic relationship was found between relative fluctuating asymmetry and tonic immobility or leukocyte ratio. A significant negative genetic correlation between tonic immobility and leukocyte ratio was found, although the phenotypic association between them was zero.

Keywords: *fluctuating asymmetry, stress, fear, correlations, chickens*

EVALUACIÓN GENÉTICA DEL CABALLO TROTADOR ESPAÑOL MEDIANTE UN MODELO THRUSTONIANO

Gómez, M.D.¹, Varona, L.², Valera, M.³ y Molina, A.¹

¹ Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba.

² Departamento de Anatomía, Embriología y Genética. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.

³ Departamento de Ciencias Agro-forestales. E.U.I.T.A. Universidad de Sevilla. Sevilla.

INTRODUCCIÓN

El Caballo Trotador Español (CTE) es una raza equina criada específicamente para la disciplina que lleva su nombre. Su programa de mejora incluye como objetivo principal la consecución de un animal que destaque tanto en las competiciones nacionales como internacionales, con una conformación que favorezca su funcionalidad y un temperamento que le haga ansiar la victoria (<http://www.mapa.es/ganaderia/pags/equino/seleccion/trotador.pdf>).

El rendimiento deportivo del CTE ya ha sido valorado genéticamente mediante el empleo de la metodología BLUP modelo animal (Gómez et al., 2007) utilizando el archivo histórico de datos deportivos de la Federación Balear de Trote, lo que ha dado lugar a la publicación del primer Catálogo de Reproductores de esta raza (Gómez et al., 2008). Así mismo, se trabaja en la aplicación de nuevas metodologías de valoración genética que aporten una mayor cantidad de información objetiva a los ganaderos, como son los modelos de Regresión Aleatoria (Gómez et al., 2008b).

Sin embargo, en esta disciplina, así como en la mayoría de las competiciones deportivas, el establecimiento de un ranking real para la aptitud deportiva es muy complejo, dadas las interrelaciones que se establecen entre caballo y jinete y la dificultad de modelizar la competencia existente entre los individuos que participan en la carrera. Por ello, el objetivo principal de este estudio consiste en valorar la utilidad de los modelos Thurstonianos (Gianola y Simianer, 2006) para evaluar los resultados de competiciones deportivas con competencia, utilizando como ejemplo las carreras de trote en España.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

La información utilizada en este estudio ha sido recopilada por la Federación Balear de Trote, e incluye tiempos, ganancias y puntos clasificatorios de cada animal participante en una carrera, además de los principales efectos ambientales para cada caballo (fecha, hipódromo, distancia de carrera, modo de salida, jinete, etc.) y otra información adicional sobre los animales (sexo, edad, etc.).

La base de datos inicial contaba con un total de 285.538 registros de participación de 5086 animales diferentes, recogidos entre los años 1990 y 2006. Para este estudio se han eliminado todas las carreras pertenecientes a la variedad de trote montado, por ser minoritarias en España. Así mismo, se han eliminado las participaciones correspondientes a los hipódromos con menos de 1000 carreras registradas y las carreras con menos de 5 animales participantes. La base de datos final se compone de 41044 registros de participación correspondientes a 2618 animales.

Metodología

Este estudio se ha realizado sobre la variable *puesto clasificatorio en el ranking de una carrera* ya que nos permite la comparación directa de competiciones celebradas en diferentes países al presentar una misma interpretación a nivel internacional (Bokor et al., 2005). Así mismo, nos permite comparar caballos que participan en un mismo evento deportivo en relación con el resto de participantes de otros eventos, independientemente del nivel del concurso (Tavernier, 1990).

El modelo thurstoniano para el análisis de rangos (Gianola y Simianer, 2006) utilizado asume una variable subyacente que se transforma en la clasificación de los individuos dentro de cada competición. La variable subyacente asignada al ganador es igual a 0, la del segundo clasificado es un valor inferior a la del primero, la del tercero es inferior a la del segundo, y así sucesivamente hasta el último clasificado.

El modelo de análisis para esta variable subyacente fue: $I = Xb + Tj + Wp + Zu + e$

Donde **b** es el vector de efectos sistemáticos (sexo, edad y competición), **j** es el vector de efectos jinete-entrenador, **p** es el vector de efectos permanentes asociados al caballo, **u** es el vector de efectos genéticos aditivos, **e** es el vector de efectos residuales y **X**, **T**, **W** y **Z** son las matrices de incidencia.

Se asumieron distribuciones a priori normales multivariantes para **j**, **p**, **u** y **e**, y uniformes para los efectos sistemáticos y los componentes de varianza. La varianza residual se fijó arbitrariamente en 1.

Se realizó un análisis bayesiano mediante muestreo de Gibbs (Gelfand y Smith, 1990) con un paso de aumento de datos para la variable subyacente del modelo Thurstoniano (Gianola y Simianer, 2006). En la base de datos la posición superior al cuarto clasificado no se registra, por lo que se diseñó una modificación del procedimiento de aumento de datos para contemplar este hecho.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento de análisis proporciona las distribuciones posteriores marginales tanto de los componentes de varianza como de los valores de cría de los individuos. En la tabla 1 se presentan los componentes de la varianza estimados para la variable analizada mediante la aplicación de un modelo Thurstoniano. La heredabilidad de la variable subyacente es de 0.09. Este valor es bastante reducido, si se compara con los obtenidos mediante la aplicación de otras metodologías de valoración genética.

En la tabla 2 se presenta el rendimiento fenotípico (en función de la posición clasificatoria de los animales en el ranking de una carrera) de los tres mejores y los tres peores animales con datos según su valor de cría obtenido mediante la aplicación de esta metodología. Se puede observar cómo los mejores animales con datos han obtenido un mayor número de veces la primera clasificación en el ranking de carrera. Por el contrario, los peores no han superado el tercer puesto de clasificación.

El modelo empleado nos ha permitido fijar el efecto carrera, de manera que se han corregido los resultados obtenidos en función de la calidad de la competencia de una carrera determinada (el nivel del conjunto total de animales que participan en una misma carrera). De esta manera, se ha valorado más positivamente a todos aquellos animales que han obtenido una determinada posición clasificatoria en una carrera de gran nivel de competencia que a aquellos que han obtenido la misma posición clasificatoria en carreras con menor nivel de competencia. Así en la tabla 3 se presenta el listado de animales participantes en las carreras con el mejor y el peor efecto carrera. Estas carreras se corresponden con aquellas con mejor y peor media de participación, en las que necesariamente no tienen porqué participar los animales con mejores valores genéticos, como se observa al comparar las identificaciones presentadas en las tablas 2 y 3.

El modelo corrige el efecto de competencia y pondera la información de la posición del caballo en función de sus competidores evitando el sesgo producido por la heterogeneidad en el nivel competitivo de las competiciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bokor, A., Blouin, C., Langlois, B. & Stefler, J. 2005. *Ital. J. Anim. Sci.* 4 (Suppl. 3), 43–45.
- Gelfand, A. & Smith, A.F.M. 1990. *J. Am. Stat. Assoc.* 89, 398-409.
- Gianola, D. & Simianer, H. A. 2006. *Genetics* 174:1613-1624.
- Gómez, M.D., Pieramati, C., Cervantes, I., Azor, P.J., Molina, A. & Valera, M. 2006. 9th Congress of the World Equine Veterinary Association. Marrakech. 22-26 January.
- Gómez, M.D., Cervantes, I., Molina, A., Moll, P. & Valera, M. 2007. Book of Abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Dublin, Ireland. 26-29 August.
- Gómez MD., M. Valera, A. Molina, C. Medina, E. Bartolomé & I. Cervantes. 2008a. *ISSB*. 978-84-930683-7-0. Ed. Universidad de Córdoba.
- Gómez, M.D., Menéndez-Buxadera, A., Molina, A. & Valera, M. 2008b. Book of Abstracts of the 59th Annual Meeting of the European Association for Animal Production.

Vilnius, Lithuania. 24-27 August. • Langlois, B. 1984. Genet. Selec. Evol. 14 (3), 399-414. • Tavernier, A. 1990. Livest. Prod. Sci. 26, 277-290.

Tabla 1. Componentes de la varianza para el ranking en Caballos Trotadores Españoles a partir de la aplicación de un modelo Thrustoniano.

Var.	Media Posterior	Desv. Tip. Posterior
σ_a^2	0.14	0.03
σ_j^2	0.26	0.03
σ_p^2	0.11	0.02
h^2	0.09	0.02

Tabla 2. Rendimiento fenotípico presentado por los mejores y peores individuos en función de su valor de cría.

Ranking valoración genética/Posiciones en carrera	1°	2°	3°	4°	Total Colocados	Total no colocados(>4°)
1°	73,3	10,0	3,3	3,3	90,0	10,0
2°	46,7	33,3	0,0	0,0	80,0	20,0
3°	58,1	9,7	0,0	0,0	67,7	32,3
....						
10938°	0,0	0,0	11,8	0,0	11,8	88,2
10939°	0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	80,0
10940°	0,0	0,0	3,6	0,0	3,6	96,4

Tabla 3. Listado de los participantes de las carreras con mejor y peor "efecto carrera"

Carrera Mejor	Carrera Peor
5	2245
9	3497
11	10074
13	10127
62	10359
80	10774
103	10783
151	10936
179	
194	
1461	
2925	

GENETIC EVALUATION OF SPANISH TROTTER HORSES BY THRUSTONIAN MODELS

ABSTRACT: Traditionally, Spanish Trotter Horses are selected for racing performance using BLUP animals models. The importance of competitive information supports the use of thrustonian models to evaluate the performance within competition. The usefulness of this model was tested for the trait ranking place. Adequate results were obtained. The model corrected by competition effect and adjusted the ranking place of the horse according to the level of the rivals in the race. This avoids the heterogeneity of the competition level in the race.

Keywords: Competition, Equine, Heritability.

SELECCIÓN POR TASA DE OVULACIÓN EN CONEJO. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA CORRELACIÓN ENTRE TASAS DE OVULACIÓN.

Laborda, P.¹, Mocé, M.L. y Santacreu, M.A.

Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia.

¹ patlavi@dca.upv.es. P.O. Box 22012. 46071 Valencia. Spain

INTRODUCCIÓN

El tamaño de camada es un carácter de importancia económica para el que, sin embargo, la respuesta obtenida en la selección directa ha sido baja. Como alternativa, diversos autores han propuesto la selección por tasa de ovulación, cuya heredabilidad es mayor que la del tamaño de camada y está relacionada con él. En cerdo y en ratón, la selección por tasa de ovulación ha tenido éxito (Clutter et al., 1990, en ratón; Lamberson et al., 1991, Rosendo et al., 2007, en cerdo), aunque la respuesta correlacionada en tamaño de camada ha sido baja en ambos casos. El objetivo de este estudio es analizar la respuesta a la selección por tasa de ovulación en conejo a lo largo de 8 generaciones y estimar la correlación genética entre dos medidas de tasa de ovulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Los animales pertenecen a una línea de conejos seleccionada por tasa de ovulación a lo largo de 8 generaciones. La selección se realiza en base al valor fenotípico de la hembra, que se mide el día 12 de la segunda gestación mediante laparoscopia. Las generaciones están formadas aproximadamente por 80 hembras y 20 machos. La presión de selección es aproximadamente del 30%.

Caracteres: Los caracteres analizados han sido la tasa de ovulación de la 2ª gestación (TO2) y la tasa de ovulación de gestaciones posteriores tomada como un solo carácter (TO>2). Se han analizado 680 datos de tasa de ovulación de la 2ª gestación y 508 datos de tasa de ovulación de gestaciones posteriores. TO2 se ha estimado como el número de cuerpos lúteos contabilizados mediante laparoscopia. TO>2 se ha estimado *post mortem* en diferentes días de gestación y en distintas gestaciones.

Análisis estadísticos: Los análisis genéticos se han hecho por métodos bayesianos. Para estimar las heredabilidades y las correlaciones se ha realizado un análisis bivalente. Para el carácter TO2 se ha utilizado el modelo:

$$Y_{ijk} = G_i + L_j + u_{ijk} + e_{ijk}$$

donde G_i es el efecto ambiental de la generación (9 niveles), L_j es el estado de lactación (2 niveles: lactante y no lactante), u_{ijk} es el valor aditivo del animal y e_{ijk} es el residuo del modelo.

Para el carácter TO>2 se ha utilizado el mismo modelo añadiendo el efecto del orden de gestación OP, agrupando las gestaciones en 3 niveles (1: 3ª gestación, 2: 4ª y 5ª gestación, 3: 6ª y 7ª gestación) de acuerdo con análisis exploratorios previos.

Para estimar las tendencias genéticas, se ha considerado que todas las tasas de ovulación son genéticamente el mismo carácter (TO), debido a la elevada correlación genética que mostraron TO2 y TO>2. Se ha ajustado el modelo de repetibilidad siguiente:

$$Y_{ijklm} = G_i + L_j + OP_k + u_{ijkl} + p_{ijkl} + e_{ijklm}$$

donde p_{ijkl} es el efecto permanente no aditivo y OP_k , con 3 niveles: (1: 2ª y 3ª gestación, 2: 4ª y 5ª gestación, 3: 6ª y 7ª gestación)

Los parámetros de las distribuciones marginales posteriores se estimaron mediante muestreo de Gibbs. Se utilizó una cadena de 1,000,000 de iteraciones, con un periodo de quemado de 200,000 iteraciones, tomándose una muestra de cada 100 iteraciones. Se comprobó la convergencia con el criterio de Geweke. *A priori*, todas las distribuciones fueron

planas salvo las de los efectos aditivo y permanente, que fueron normales, de media 0 y varianzas σ_u^2, σ_p^2 respectivamente. Los priors de las varianzas fueron planos y positivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran las medias, las desviaciones estándar y el número de datos de la tasa de ovulación (TO) de todas las gestaciones. La media de la generación base es similar a la de Viudes de Castro et al. (1995) (14.8 óvulos) y superior a la de García et al. (2001) (12.6 óvulos), publicadas en otras líneas.

En la tabla 2 se presentan los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las heredabilidades y de las correlaciones genética y fenotípica de TO2 y TO>2. Las heredabilidades estimadas para TO2 y TO>2 son similares a las de Blasco et al. (1993^a) (0.21), Bolet et al. (1994) (0.24) y García et al. (2001) (0.35) en conejo, a las de Rosendo et al. (2007) (0.33) en cerdo, y a las de Land y Falconer (1969) (0.31) y Clutter et al. (1990) (0.33) en ratón, aunque sustancialmente inferiores a otras estimas publicadas en cerdo (ver Blasco et al. (1993b) para una revisión). La correlación genética entre la tasa de ovulación en la segunda gestación y la tasa de ovulación en gestaciones posteriores es alta (0.97), pudiendo asegurarse con un 95% de probabilidad que es al menos 0.72 (valor de k en la tabla 2). La correlación fenotípica es muy inferior (0.28). Rosendo et al. (2007) obtuvo coeficientes de correlación similares en un experimento de selección por tasa de ovulación en porcino ($r_g=0.89$; $r_p=0.33$).

Las tendencias genéticas para TO se muestran en la figura 1. En ella se puede observar que la tasa de ovulación ha aumentado en aproximadamente 1.65 óvulos en 8 generaciones, una media de 0.21 óvulos por generación. En porcino, la respuesta a la selección por generación se encuentra en un rango variable: entre 0.31 óvulos (Newton et al. 1975) y 0.60 óvulos (Rosendo et al. 2007).

CONCLUSIONES: En este experimento de selección por tasa de ovulación en conejo, la tasa de ovulación ha aumentado. La tasa de ovulación de la segunda gestación está muy correlacionada genéticamente con la tasa de ovulación de gestaciones posteriores consideradas todas ellas como un carácter.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blasco, A., Santacreu, M.A., Thompson, R. & Haley C.S. 1993a. *Livest. Prod. Sci.* 34:163-174.
- Blasco, A., Bidanel, J.P., Bolet, G., Haley, C. & Santacreu, M.A. 1993b. *Lives. Prod. Sci.* 37:1-21.
- Bolet, G., Santacreu, M., Argente, M., Climent, A. & Blasco, A. 1994. 5th World Cong. Genet. Ap. *Livest. Prod.* Vol.19:261-264.
- Clutter, A.C., Nielsen, M.K., & Johnson, R.K. 1990. *J. Anim. Sci.* 68:3536-3542.
- García, M.L., Baselga, M., Lavara, R. & Vicente, J.S. 2001. ITEA.
- Lamberson, W.R., Johnson, R.K., Zimmerman, D.R. & Long, T.E. 1991. *J. Anim. Sci.* 69:3129-3143.
- Newton, J.R., Cunningham, P.J. & Zimmerman, D.R. 1977. *J Anim Sci.* 44:30-35.
- Rosendo, A., Druet, T., Gogué, J. & Bidanel, J.P. 2007. *J. Anim. Sci.* 85:356-364.
- Viudes de Castro, M.P., García Ximenez, F. & Vicente, J.S. 1995. *Investigación agraria. Producción y sanidad animales.* Vol 10(2).

Tabla1: Media, desviación estándar (sd) y número de datos (N) para la tasa de ovulación (TO) en cada generación.

Generación	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Media	14.87	15.43	15.71	16.42	15.72	15.49	16.23	15.65	15.92
sd	2.24	2.62	2.65	2.38	2.73	2.41	2.18	2.30	2.50
N	134	127	157	130	101	104	172	131	131

Tabla 2: Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las heredabilidades de la tasa de ovulación en la segunda gestación (TO2) y en gestaciones posteriores (TO>2) y de las correlaciones genética (r_g) y fenotípica (r_p) entre las dos tasas de ovulación.

	Media	Mediana	HPD (95%)	k
h^2_{TO2}	0.24	0.25	0.05, 0.40	0.08
$h^2_{TO>2}$	0.29	0.29	0.15, 0.42	0.18
r_g	0.93	0.97	0.72, 1.00	0.72
r_p	0.28	0.28	0.19, 0.37	0.20

HPD (95%): Intervalo de máxima densidad al 95%; k: límite del intervalo $[k, \infty)$ conteniendo una probabilidad del 95%.

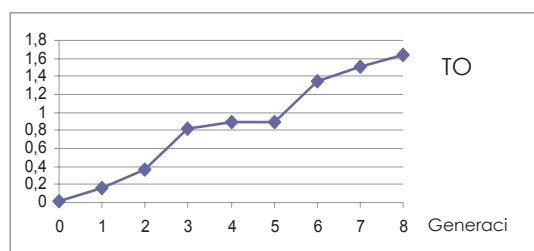


Figura 1: Tendencias genéticas para la tasa de ovulación (TO).

Agradecimientos: A Rosa Peiró, por su colaboración en los análisis estadísticos. Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (AGL2005-07624-C03-01).

SELECTION FOR OVULATION RATE IN RABBIT. CORRELATION BETWEEN TWO MEASURES OF OVULATION RATE. PRELIMINARY RESULTS.

ABSTRACT: The present study was designed to evaluate the response to selection for ovulation rate in rabbits during eight generations and to establish the correlation among ovulation rate in different gestations. Selection was based on phenotypic value of ovulation rate measured by laparoscopy at day 12 of their second gestation. Pressure of selection for does was close to 30%. Line size was approximately 20 males and 80 females per generation. Traits recorded were ovulation rate at second gestation (TO2) by laparoscopy and at later gestations (TO>2) *post mortem*. Data from 680 laparoscopies and 508 sacrifices were analyzed using Bayesian methods. Heritabilities of TO2 and TO>2 were 0.25 and 0.29 respectively. Genetic (r_g) and phenotypic (r_p) correlation were 0.97 and 0.28 respectively. Selection increased ovulation rate in 1.65 oocytes in eight generations of selection.

Keywords: ovulation rate, selection, correlation

SELECCIÓN DIVERGENTE POR VARIABILIDAD EN EL TAMAÑO DE CAMADA EN CONEJO. RESULTADOS DE LAS DOS PRIMERAS GENERACIONES.

Argente, M.J.^{1*}, García, M.L.¹, Muelas, R.¹, Santacreu, M.A.² y Blasco, A.²

¹Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra de Beniel Km 3,2, 03312 Orihuela, Spain.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia, P.O. Box 22012. 46071 Valencia, Spain.
mj.argente@umh.es

INTRODUCCIÓN

El aumento de la homogeneidad en el tamaño de camada tiene un doble interés en especies ganaderas como el porcino y el conejo; puesto que por un lado se reduciría el número de adopciones, facilitando el manejo diario al ganadero con la consiguiente reducción de costes en la explotación, y por otro lado se podría aumentar la heredabilidad del carácter tamaño de camada. La idea subyacente en este último punto es que la variación ambiental del tamaño de camada está determinada en parte por genes (SanCristobal-Gaudy et al., 1998), por lo que una reducción de la varianza ambiental del tamaño de camada aumentaría su heredabilidad y como consecuencia su respuesta a la selección. Estudios recientes han puesto en evidencia que es posible llevar a cabo este tipo de selección tanto en porcino (Sorensen y Waagepetersen, 2003) como en ratón (Gutiérrez et al., 2006), y en conejo (Ibáñez-Escriche et al., 2008b).

El objetivo de este trabajo es estimar la respuesta a la selección en un experimento de selección divergente para la varianza fenotípica del tamaño de camada en conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Los animales utilizados en este estudio proceden de las dos primeras generaciones de un experimento de selección divergente por varianza fenotípica del tamaño de camada. La población base de este experimento se constituyó con los descendientes elegidos al azar de una población F2. Esta población F2 se generó con el cruce de dos líneas de conejos seleccionadas divergentemente por capacidad uterina. Los detalles sobre la fundación de esta población F2 pueden encontrarse en Peiró et al. (2008). Los animales fueron criados en la granja de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Esta granja tiene un ambiente controlado con un fotoperiodo constante de 16 h de luz: 8 h de oscuridad. Las hembras fueron llevadas por primera vez a la monta a las 18 semanas de edad, para proseguir con un manejo en bandas semanales con montas 12 días post-parto. En la Tabla 1 se muestra el número de hembras, número de partos y número promedio de partos por hembra por generación y línea.

El criterio de selección fue la varianza fenotípica del tamaño de camada dentro de cada hembra después de corregir el tamaño de camada por los efectos de año-estación y el estado de lactación (V). El efecto del año-estación incluyó 11 niveles y el efecto de lactación 3 niveles (hembras núlparas, hembras lactantes y hembras no lactantes con más de un parto). V dentro de hembra fue calculado como:

$$V_i = \frac{1}{n_i + 1} \sum_{k=1}^{k=n_i} (e_{ik} - \bar{e}_i)^2$$

Donde n_i es el número de partos de la hembra i , e_{ik} es el tamaño de camada del parto k de la hembra i después de ser corregido por los efectos de año-estación y estado de lactación. La presión de selección fue de un 30% en cada línea. Los machos fueron elegidos dentro de familias de padre para evitar el incremento de la consanguinidad.

Caracteres. Los caracteres analizados fueron la varianza fenotípica del tamaño de camada dentro de hembra después de corregir el tamaño de camada por los efectos de año-estación y estado de lactación (V), la varianza fenotípica del tamaño de camada dentro de hembra sin corregir (σ^2_{TC}) y el tamaño de camada promedio dentro de hembra (TC).

Análisis estadísticos. Todos los análisis se realizaron utilizando metodología bayesiana. Las variables V , σ_{TC}^2 y TC fueron analizadas con un modelo que sólo tenía como efecto la línea-generación (con 5 niveles). Para los efectos se utilizó un prior plano acotado, y se asumió que las variables analizadas tenían una distribución normal. Las distribuciones marginales posteriores de los parámetros desconocidos se estimaron usando muestreo de Gibbs. Después de algunos análisis exploratorios, se tomó una cadena de 200.000 iteraciones con un periodo de quemado de 20.000 iteraciones y se guardó una muestra de cada 50 iteraciones. La convergencia fue probada usando el criterio Z de Geweke (Sorensen y Gianola, 2002) y los errores de Monte Carlo fueron obtenidos usando el procedimiento de series temporales descrito por Geyer (1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este experimento se seleccionó por variabilidad fenotípica total en lugar de variabilidad ambiental estimada. Esta última es difícil de estimar con pocos datos, por lo que seleccionando por varianza fenotípica evitamos los elevados errores de estimación en un carácter objeto de selección. Por otro lado más del 90% de la varianza del tamaño de camada es ambiental (ver, p. ej. Revisión de Blasco, 1996), por lo que la selección debería actuar preferentemente sobre este componente.

En la Tabla 2 se muestran las medias para las variables V , σ_{TC}^2 y TC . La σ_{TC}^2 y el TC dentro de hembra presentan medias menores a las publicadas previamente por Blasco et al. (1994) y Santacreu et al. (2005), pero esto se debe a que las varianzas de la Tabla 2 son varianzas dentro de hembra, sobre las que no hemos encontrado datos en la bibliografía. En la misma tabla se presentan los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre las líneas de alta (H) y de baja (L) variabilidad del tamaño de camada en la primera y segunda generación de selección. Las distribuciones fueron aproximadamente normales, por lo que se presenta solamente la media posterior de la diferencia. En todas las variables, el test de Geweke no detectó falta de convergencia y el error de Monte Carlo fue pequeño.

Las líneas H y L mostraron un diferencia de 0.49 ($P(D>0) = 89\%$, Tabla 2) para V en la primera generación de selección. Esta diferencia se incrementó en la segunda generación de selección ($D = 1.04$, $P(D>0) = 93\%$, Tabla 2). La selección por V parece mostrar una respuesta correlacionada con la varianza fenotípica del tamaño de camada (σ_{TC}^2), siendo las diferencias entre las líneas de 0.59 ($P(D>0) = 87\%$, Tabla 2) en la primera generación y 0.91 ($P(D>0) = 95\%$, Tabla 2) en la segunda generación. El incremento de la variabilidad del tamaño de camada en la línea H parece estar asociado a una disminución del tamaño de camada en esta línea ($D = -0.31$, $P(D<0) = 99\%$, en la primera generación, y $D = -0.36$, $P(D<0) = 99\%$, en la segunda generación, Tabla 2). Este resultado está de acuerdo con la correlación negativa entre la varianza ambiental del tamaño de camada y el tamaño de camada (-0.75) encontrada por Ibañez-Escriche et al. (2008a) en esta población.

CONCLUSIÓN

Los primeros resultados de este estudio sugieren que la varianza del tamaño de camada parece estar bajo control genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blasco, A. 1996. 6th World Rabbit Congress. Toulouse, 1996. 2: 219-228.
- Blasco A., Argente M.J., Haley C., Santacreu M.A. 1994. *J. Anim. Sci.*, 72, 3066–3072.
- Geyer C.M. 1992. *Statist. Sci.*, 7, 467–511.
- Gutiérrez J.P., Nieto B., Piqueras P., Ibañez N., Salgado C. 2006. *Genet. Sel. Evol.*, 38, 445-462.
- Ibañez-Escriche N., Argente M.J., García M.L., Muelas R., Santacreu M.A., Blasco, A. 2008a. In *Proc. 9th World Rabbit Congress, 2008 September, Verona, Italy*. Vol 1: 121-124.
- Ibañez-Escriche N., Sorensen D., Waagepetersen R. Blasco A. 2008b. *Genetics*, 180: 2209-2226.
- Peiró R., Merchán M., Santacreu M.A., Argente M.J.,

García M.L., Folch J.M., Blasco A. 2007. *Genetics*, 180: 1699-1705. • SanCristobal-Gaudy M., Bodin L., Elsen J.M., Chevalet C. 1998. *Genet. Sel. Evol.*, 33, 249-271. • Santacreu M.A., Mocé M.L., Climent A., Blasco A. 2005. *J. Anim. Sci.*, 83, 2303–2307. • Sorensen D., Gianola D. 2002. Springer, New York. USA. • Sorensen D., Waagepetersen R. 2003. *Genetical Research.*, 82, 202-222.

Tabla 1. Número de hembras (N), número de partos y número promedio de partos por hembra por generación y línea.

	BASE	G1		G2	
		H	L	H	L
N	266	135	149	117	118
Número de partos	989	592	667	506	457
Partos por hembra	2.5	2.97	2.96	3.01	2.68

BASE: generación base. G1: primera generación de selección. G2: segunda generación de selección. H: línea de alta variabilidad del tamaño de camada. L: línea de baja variabilidad del tamaño de camada.

Tabla 2. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre las líneas de alta (H) y de baja (L) variabilidad del tamaño de camada, medida como la varianza fenotípica dentro de hembra después de corregir el tamaño de camada por año-estación (V) el estado de lactación (V), varianza fenotípica del tamaño de camada sin corregir (σ_{TC}^2) y tamaño de camada promedio dentro de hembra (TC).

	Media	D	G1		D	G2	
			HPD _{95%}	P(%)		HPD _{95%}	P(%)
V	3.73	0.49	-0.34, 1.20	89	1.04	0.23, 1.86	93
σ_{TC}^2	4.87	0.59	-0.49, 1.52	87	0.91	-0.14, 1.98	95
TC	8.23	-0.31	-0.81, 0.12	91	-0.36	-0.85, 0.13	92

G1: primera generación de selección G2: segunda generación de selección. D: media posterior de la diferencia entre las líneas de alta (H) y baja (L) variabilidad del tamaño de camada. HPD_{95%}: región de alta densidad posterior al 95%. P: P(D>0) cuando D>0 y P(D<0) cuando D<0.

Agradecimientos: Este experimento ha sido financiado con los proyectos CICYT AGL2005-07624-C03-03 y AGL2008-05514-C02-02.

DIVERGENT SELECTION FOR VARIABILITY OF LITTER SIZE IN RABBIT. RESULTS AFTER TWO GENERATIONS OF SELECTION.

ABSTRACT: A divergent selection experiment on phenotypic variance of litter size was carried out in rabbits. Selection was based on phenotypic variance of litter size for each doe after correcting litter size for the effects of year-season and lactation status (V). Selection pressure on does was approximately 30% in each line. Males were chosen within sire families in order to avoid the increase of inbreeding. Results of the first two generations of selection were analyzed using Bayesian methods. The High line (H) showed a higher V than the Low line (L) in the first (0.49, P(D>0) = 89%) and the second (D = 1.04, P(D>0) = 93%) generation of selection. This difference in V seems to be associated with an increase in the phenotypic variance of litter size in the first (59 (P(D>0) = 87%) and second generation (0.91 (P(D>0) = 95%) in the H line, and a decrease in litter size in this line (D = -0.31 kits, P(D<0) = 99%, in the first generation, D = -0.36 kits, P(D<0) = 99%, in the second generation).

The first preliminary results of this study suggest that the variance of litter size seems to be under genetic control.

Keys words: Selection, variance, litter size, rabbits

SELECCIÓN DIVERGENTE POR CONSUMO DE AGUA EN LA CODORNIZ JAPONESA.

DETERMINACIÓN GENÉTICA DEL CARÁCTER Y RESPUESTA A LA SELECCIÓN

Ragab, M. ^{1,2,*}, Peiró, R. ², Saleh, K. ¹, Younis, H. ¹, Nogal, R. ¹ y Baselga, M. ²

¹Departamento de Ciencia Avícola, Fac. de Agric., Universidad Kafrelsheikh, Egipto.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, U. Politécnica de Valencia, España.
*mogha@posgrado.upv.es

INTRODUCCION

En aves hay evidencia experimental de la existencia de relaciones genéticas entre el consumo de agua y características productivas, como el peso corporal. Así, por ejemplo, en líneas de codornices seleccionadas por mayor peso corporal, el consumo de agua era mayor que en las seleccionadas por menor peso (Marks, 1985, Darden y Marks, 1988). También, en pollos seleccionados para aumentar el peso corporal, el consumo de agua excedía en un 9.3% al control, cuando la cría se hacía a temperatura alta, y en un 5.3 % cuando la temperatura era normal (Deeb y Cahaner, 2002). Es también probable que el consumo de agua esté relacionado con la resistencia a situaciones de estrés, como las derivadas de la cría de las aves en climas cálidos. Se plantea la realización de un experimento de selección divergente por consumo de agua en codornices japonesas para estimar los parámetros genéticos de este carácter, sus relaciones genéticas con otros caracteres de interés y las respectivas respuestas, directa y correlacionadas, a la selección.

MATERIAL Y METODOS

Se constituyó una población base a partir de huevos de una manada comercial de los que se obtuvieron mil pollitos de un día. Cuando las aves alcanzaron las siete semanas de edad se controló el consumo de agua y la puesta de huevos durante 30 días. Seguidamente las codornices se dividieron en tres líneas. Una, formada por el 25% de las codornices elegidas al azar, dio origen a la línea control. El resto se dividió en la línea alta y baja de acuerdo con el consumo de agua. Se guardó un macho por cada dos hembras. Las codornices anteriores dieron origen a la primera generación de cada línea, en las que se controlaron el consumo de agua y la puesta a partir de la semana siete, durante 30 días. En las líneas alta y baja se aplicó una presión de selección de 0.5, dando origen a la segunda generación, con las que se continuó el proceso. Por generación, el número de hembras y machos fueron alrededor de 60 y 30 en las líneas de selección y de 40 y 20 en la línea control.

Los caracteres registrados fueron el peso a las seis semanas de edad (PC), el consumo de agua (CA) ya mencionado, durante 30 días desde el inicio de la séptima semana, el consumo de pienso (CP), el peso del huevo (PH) y la masa de huevos puestos (MH) durante el mismo período. Además, basados en los anteriores registros se calcularon el ratio agua: pienso (CA:CP) y el índice de conversión de pienso en masa de huevo (IC).

El experimento tuvo lugar en la Universidad de Kafrelsheikh (Egipto) situada en el delta del Nilo.

El modelo utilizado para el análisis genético de los caracteres fue un modelo animal con los efectos fijos sexo (salvo para PH, MH e IC) y año-estación. Se hicieron análisis bivariantes, entre el consumo de agua y cada uno de los caracteres restantes para estimar la heredabilidad y las correlaciones genéticas y residuales correspondientes, siguiendo una metodología REML (Neumaier y Groeneveld, 1998).

Para el estudio de la respuesta a la selección se utilizó un modelo de efectos fijos que incluía el sexo (salvo para MH e IC) y la combinación línea-generación (7 grupos, la población base constituyó un solo grupo). Se fijó un nivel $\alpha=0.05$, como error de primer tipo para determinar la significación de los contrastes de las líneas seleccionadas respecto al control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra las heredabilidades de los caracteres y sus correlaciones genéticas y residuales con el consumo de agua.

Tabla 1. Estimaciones de parámetros genéticos del consumo de agua (CA), consumo de pienso (CP), ratio agua: pienso (CA: CP), peso del cuerpo a las seis semanas (PC), peso del huevo (PH), masa de huevo (MH) y conversión de pienso en huevo (IC). Heredabilidades (h^2) y correlaciones genéticas (r_g) y residuales (r_e) con el consumo de agua.

Carácter	h^2	r_g	r_e
CA	0.46 ± 0.04	-	-
CP	0.33 ± 0.03	0.87 ± 0.04	-0.02 ± 0.04
CA:CP	0.30 ± 0.03	0.98 ± 0.00	0.90 ± 0.00
PC	0.72 ± 0.03	0.76 ± 0.03	0.21 ± 0.06
PH	0.66 ± 0.06	0.67 ± 0.04	0.11 ± 0.09
MH	0.34 ± 0.05	0.69 ± 0.06	0.08 ± 0.07
IC	0.21 ± 0.05	-0.74 ± 0.09	0.07 ± 0.06

Destacan las altas heredabilidades obtenidas para los pesos corporales y de huevo, similares a las obtenidas por otros autores (Sato *et al.*, 1989a; Toelle *et al.*, 1991 y Minvielle, 1998 para el peso corporal y Sato *et al.*, 1989b; Zhang *et al.*, 2003 y Sezer, 2007, 2008 para el peso del huevo). Saatci *et al.* (2006) obtuvieron una heredabilidad media (0.25) para el peso del huevo. El resto de caracteres tuvieron heredabilidades medias-altas, entre 0.30 y 0.46, salvo IC que tuvo una heredabilidad media. Resultados similares se han obtenido por Chambres (1990) y Zhang *et al.* (2003) para el consumo del pienso, por Sabri *et al.* (1999) para la masa de huevo y por Pym (1990) y Chambers *et al.* (1994) para el índice de conversión de pienso.

Respecto a las correlaciones de los caracteres con el consumo de agua destacan las relativas al ratio consumo de agua:consumo de pienso. En este caso tanto la correlación genética como la residual son prácticamente uno. La situación para los otros caracteres responde a otro patrón, común para todos ellos, con un determinismo genético muy semejante, como indican los valores absolutos de las correlaciones genéticas (entre 0.67 y 0.87) y una independencia ambiental respecto al consumo de agua, como indican las bajas correlaciones residuales (entre 0.02 y 0.21), situación similar a la obtenida por Skinner-Noble y Teeter (2004) para la correlación genética entre el consumo de agua y el consumo de pienso. El conjunto de los resultados anteriores indican que las correlaciones genéticas entre el consumo de agua y los caracteres que hemos estudiado son importantes y favorables, de tal manera que la consideración del consumo de agua puede ser de utilidad en programas de mejora genética de la codorniz, como vamos a ver al comentar los resultados de las respuestas, directa y correlacionadas, obtenidas en este experimento y que se presentan en la Tabla 2.

La respuesta directa en la línea alta ha sido importante, 16% de la media del carácter, y significativa estadísticamente. En la línea baja la respuesta no ha sido estadísticamente significativa y se ha evidenciado la asimetría de la respuesta en ambas líneas. En lo que se refiere a las respuestas correlacionadas, la respuesta en el ratio consumo de agua:consumo de pienso el resultado es similar al de la respuesta directa, es decir una importante respuesta en la línea alta (9% de la media) y una respuesta no significativa en la línea baja. El resultado es bastante semejante para el consumo de pienso, para el que la asimetría de la respuesta es también evidente, si bien las respuestas son significativas en ambas líneas, 6% de la media en la línea alta y 1.7% en la baja. En el resto de caracteres las respuestas han sido significativas en ambas líneas y no hay evidencias de asimetría, siendo como promedio de ambas líneas el 4.5% de la media para el peso corporal y 12% tanto para la masa de huevo como para el índice de conversión de pienso en masa de huevo.

Tabla 2. Respuesta a la selección por consumo de agua (CA) y respuesta correlacionada con el consumo de pienso (CP), ratio agua:pienso (CA:CP), peso del cuerpo a las seis semanas (PC), masa de huevo (MH) y conversión de pienso en huevo (IC).

Carácter	N	Media ± DT	H vs C ¹ ± ET	L vs C ¹ ± ET
CA, g	710	1606 ± 446	257* ± 30	-53 ± 29
CP, g	710	981 ± 86	62* ± 7	-17* ± 7
CA:CP	710	1.62 ± 0.39	0.15* ± 0.02	-0.03 ± 0.02
PC, g	718	186 ± 18	10.6* ± 10.4	-6.0* ± 2.4
MH, g	460	227 ± 51	27.9* ± 10.0	-26.4* ± 10.0
IC	460	4.75 ± 1.25	-0.41* ± 0.20	0.75* ± 0.21

*: diferencia significativa, $\alpha = 0.05$; 1: H vs C (L vs C), contraste entre la línea alta (baja) en la segunda generación de selección; N, número de datos; DT, desviación típica; ET, error típico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chambers, J. R. 1990. Pages 599-643 in *Poultry Breeding and Genetics*. Crawford, R. D., ed. Elsevier, Amsterdam.
- Chambers, J. R., Wang, L. & McMillan, I. 1994. *Poult. Sci.* 73:1196–1203.
- Darden, J. R. & Marks, H. L. 1988. *Poult. Sci.* 67:1111-1122.
- Deeb, N. & Cahaner, A. 2002. *Poult. Sci.* 81:293-301.
- Marks, H. L. 1985. *Poult. Sci.* 64:425-428.
- Minvielle, F. 1998. *Proceedings 6th Asian Pacific poultry congress Nagoya*, Japan.
- Neumaier, A. & Groeneveld, E. 1998. *Genet., Sel., Evol.* 30:3-26.
- Pym, R. E. 1990. Pages 209–237 in *Poultry Breeding and Genetics*. Crawford, R. D., ed. Elsevier, Amsterdam.
- Saatci, M., Omed, H. & Dewi, I. A. 2006. *Poult. Sci.* 85:185-190.
- Sabri, M., Wilson, R., Harms, H. & Wilcox, J. 1999. *Genet. Mol. Biol.* 22(2):183-186.
- Sato, K., Matsumura, T., Kawamoto, Y. & Ino, T. 1989a. *Jikken Dobutsu*, 38:47-54.
- Sato, K., Ida, N. & Ino, T. 1989b. *Jikken Dobutsu* 38:55-63.
- Sezer, M. 2007. *J. App. Bio. Sci.* 1(2):37-40.
- Sezer, M. 2008. *Int. J. Nat. Eng. Sci.* 2 (2):77-79.
- Skinner-Noble, D. O. & Teeter, R. G. 2004. *Poult. Sci.* 83:1260-1263.
- Toelle, V. D., Havenstein, G. B., Nestor, K. E. & Harvey, W. R. 1991. *Poult. Sci.* 70:1679-1688.
- Zhang, W., Aggrey, S., Pesti, G., Edwards, H. & Bakalli, R. 2003. *Poult. Sci.* 82:1075-1079.

DIVERGENT SELECTION FOR WATER CONSUMPTION IN JAPANESE QUAIL. GENETIC DETERMINISM OF THE TRAIT AND RESPONSE TO SELECTION

ABSTRACT: An experiment of two generations of divergent selection for water consumption, including a control line, has been carried out in Japanese quails in a farm placed in the delta of the Nile. The selected proportion was $p=0.5$ in both lines, high and low. The recorded traits were: body weight at 6 weeks (BW), individual egg weight (EW) and water consumption (WC), feed consumption (FC), the ratio between both (WC:FC), total egg mass produced (EM) and conversion index of feed to egg mass (IC) during a period of 30 days started at the seven week of age. Bivariate analysis of WC and each one of the other traits were performed to estimate heritabilities, genetic and residual correlations. High heritabilities (0.72-0.66) have been obtained for BW and EW, intermediate for IC (0.21) and intermediate-high for the other traits (0.30 to 0.46). The genetic correlations between WC and the other traits were always higher than 0.67 and the residual correlations lower than 0.21, excepting for WC: FC that was 0.9. The direct and correlated responses in the high line were always significant, important and favourable, in agreement with the estimated genetic parameters (between 4.6 and 16% of the trait means). An asymmetric response was showed for WC, FC and WC: FC.

Keywords: Quails, genetics, water, consumption.

RESPUESTA A LA SELECCIÓN CONTRA GRASA DORSAL A GRASA INTRAMUSCULAR CONSTANTE EN CERDOS DUROC

Reixach, J.¹, Tor, M.² y Estany, J.²

¹Selección Batallé, Avda Segadors, s/n, 17421 Riudarenes. ²Universitat de Lleida, Departament de Producció Animal, Rovira Roure, 191, 25198 Lleida
jreixach@batalle.com

INTRODUCCIÓN

El contenido en grasa intramuscular (GIM) es un carácter relevante para aquellas líneas genéticas destinadas al mercado de curados de calidad. El carácter presenta una heredabilidad relativamente alta, pero una correlación genética desfavorable con el contenido de magro. En la población Duroc objeto de este estudio, Solanes et al. (2009) estimaron que la heredabilidad del contenido de GIM a los 180 días de edad fue 0.56 y la correlación genética entre el contenido de GIM y el espesor de tocino dorsal (GD) a los 180 días 0.64. Este resultado confirma que es posible modificar el contenido de GIM mediante selección pero que es difícil hacerlo sin aumentar GD. Bosch et al. (2005) analizaron la evolución del contenido de GIM con la edad y comprobaron que, para el rango habitual de pesos al sacrificio, el contenido de GIM se situaba en la zona alrededor del óptimo para la producción de curados. En esta situación, un objetivo de selección a considerar es el de disminuir GD procurando no modificar el contenido de GIM. Solanes et al. (2009) demostraron teóricamente que, con los parámetros genéticos estimados, ésta puede ser, en efecto, una estrategia viable. En este trabajo se presentan los resultados de un experimento de selección diseñado para comprobarlo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron en cinco lotes 100 camadas del núcleo de Duroc de Selección Batallé para menor espesor de GD (S: Grupo seleccionado) y 107 al azar (C: Grupo control), de acuerdo con la estructura de datos descrita en la Tabla 1. Las camadas seleccionadas lo fueron a partir del valor genético medio de los padres para GD a los 180 días, predicho éste mediante el modelo descrito en Solanes et al. (2009). Se impuso, mediante programación lineal, la restricción que el valor genético de la camada para el contenido de GIM a los 180 días y la ganancia media diaria desde nacimiento hasta 180 días (GMD) fuera lo más parecida posible entre grupos. De cada camada se eligieron al azar dos machos, que se castraron durante la primera semana de edad. La diferencia genética predicha entre los dos grupos (S-C) fue de -0.78 mm (entre -0.64 y -0.98, según lote), 0.03% (entre -0.03 y 0.13, según lote) y -3.91 g/d (-2.14 y -5.03, según lote), para GD, GIM y GMD, respectivamente. Los animales se alojaron en engordes comerciales y dispusieron de alimento a voluntad. Todos los cerdos se pesaron a los 120, 180 y 210 días de vida, momento en el que también se les midió GD y la profundidad de lomo a la altura de la última costilla, a unos 5 cm de la línea media mediante un equipo Piglog 105. Los cerdos se sacrificaron a los 214 días y a un peso vivo medio de aproximadamente 120 Kg.

Tabla 1. Número de padres, madres y cerdos en el grupo seleccionado y en el control.

Grupo	Padres	Madres	Cerdos con datos		
			GD	GIM jamón	GIM lomo
Seleccionado	39	100	172	134	41
Control	48	107	188	146	47

Las canales se pesaron, a la vez que se estimaba el espesor de GD y la profundidad de lomo a 6 cm de la línea media, entre la 3ª y 4ª costilla, mediante un equipo Autofom. El porcentaje de magro de la canal se estimó mediante la ecuación oficial aprobada para España. Después de 24 h a 2º C, se procedió al despiece comercial de las canales,

pesándose individualmente los jamones. Al mismo tiempo, de cada animal se recogió una muestra de 70 g de *gluteus medius* del jamón izquierdo. Se tomó una muestra de unos 200 g de *longissimus dorsi* de un subgrupo de animales elegido al azar de los dos primeros lotes. Se determinó por duplicado el contenido y la composición de GIM en ambos músculos mediante determinación cuantitativa de los ácidos grasos por cromatografía de gases, una vez obtenidos los respectivos metilésteres por transesterificación directa (Rule, 1997). Los datos se analizaron con un modelo que incluyó el lote, el grupo de selección (S y C) y la edad (o el peso a la canal) como covariable. La respuesta a la selección se estimó como la diferencia entre el grupo S y el grupo C, cuyo contraste estadístico se realizó mediante una prueba F.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cerdos del grupo S tuvieron, de acuerdo con lo esperado, menor espesor de GD sin variar significativamente ni el contenido ni en la composición de GIM (Tabla 2). Las diferencias observadas en GD fueron consistentes durante los tres meses del período de control.

Tabla 2. Medias mínimo-cuadráticas (\pm error típico) de los caracteres de engorde, calidad de canal y grasa intramuscular según edad de control y grupo de selección.

Carácter	Grupo de selección	
	S	C
<i>Medidas a 120 días</i>		
Peso corporal, kg	57.4 \pm 0.6 ^a	59.4 \pm 0.7 ^b
Grasa dorsal, mm	9.9 \pm 0.2 ^a	10.9 \pm 0.2 ^b
Profundidad lomo, mm	40.6 \pm 0.4	39.8 \pm 0.4
<i>Medidas a 180 días</i>		
Peso corporal, kg	103.3 \pm 0.9 ^a	106.4 \pm 0.9 ^b
Grasa dorsal, mm	16.2 \pm 0.3 ^a	17.8 \pm 0.3 ^b
Profundidad lomo, mm	44.8 \pm 0.3	44.9 \pm 0.3
<i>Medidas a 210 días</i>		
Peso corporal, kg	122.1 \pm 1.2 ^a	125.8 \pm 1.1 ^b
Grasa dorsal, mm	19.4 \pm 0.4 ^a	20.7 \pm 0.4 ^b
Profundidad lomo, mm	48.9 \pm 0.5	48.9 \pm 0.4
<i>Medidas de canal a 95 kg</i>		
Peso de la canal, kg	94.8 \pm 1.1 ^a	97.6 \pm 0.9 ^b
Grasa dorsal, mm	22.9 \pm 0.2	23.4 \pm 0.2
Profundidad lomo, mm	44.7 \pm 0.5	44.9 \pm 0.5
Peso jamones, kg	24.4 \pm 0.1 ^a	24.1 \pm 0.1 ^b
Porcentaje de magro, %	48.5 \pm 0.3	48.1 \pm 0.2
<i>Músculo gluteus medius</i>		
Grasa intramuscular, %	4.6 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1
Saturados, %	32.7 \pm 0.2	32.2 \pm 0.2
Monoinsaturados, %	52.0 \pm 0.2	52.5 \pm 0.2
Poliinsaturados, %	15.3 \pm 0.2	15.3 \pm 0.2
<i>Músculo longissimus dorsi</i>		
Grasa intramuscular, %	3.5 \pm 0.2	3.7 \pm 0.2
Saturados, %	34.8 \pm 0.4	35.3 \pm 0.4
Monoinsaturados, %	52.2 \pm 0.4	52.3 \pm 0.4
Poliinsaturados, %	13.0 \pm 0.4	12.4 \pm 0.4

^{a,b} Medias con diferentes superíndices dentro de una misma fila difieren ($p < 0.05$)

No se apreciaron diferencias significativas en la profundidad del lomo, pero si en el peso vivo, que fue inferior en el grupo seleccionado, y en el peso de los jamones ajustado a peso canal, que, por el contrario, fue superior en este grupo. Estos resultados confirman que existe variación genética asociada a GD que es independiente de GIM y que los modelos de evaluación genética utilizados, si se dispone de suficientes registros de GIM, son capaces de capturarla. Sin embargo, tanto la respuesta observada como la esperada, muestran que una selección de este tipo tiende a penalizar el crecimiento de los cerdos. Los valores publicados para la correlación genética entre GIM y GD son positivos, pero, en cambio, los de la correlación genética entre el contenido de GIM y el peso vivo presentan una variación considerable, y hay desde positivos (0.23; Suzuki et al., 2005) hasta negativos (-0.19; Fernández et al., 2007). En la población estudiada, la correlación genética entre GIM y peso vivo fue positiva (0.34), pero, a diferencia de Suzuki et al. (2005), la del peso vivo con GD fue más elevada (0.51), lo que condiciona la obtención de una respuesta más favorable en peso vivo. Así pues, el problema de la selección por contenido de GIM no sólo depende de la correlación entre GIM y GD, sino también de la de ambos caracteres con el peso vivo. Finalmente, señalar que, dado que la estructura de correlaciones puede variar con la edad o peso de control y el músculo muestreado, los criterios de selección deben desarrollarse teniendo en cuenta el peso de sacrificio y músculo objetivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bosch, L., Tor, M., Reixach, J. & Estany J. 2005. *ITEA vol extra* 26 :18-30 • Fernández, A., Pedro, E., Nuñez, N. & Silió, L. 2007. *Options Méditerranéennes (série A)* 76: 43-46 • Rule, D.C. 1997. *Meat Sci.* 46:23-32 • Suzuki, K., Kadowaki, H., Shibata, T., Uchida, H. & Nishida, A. 2005. *Liv. Prod. Sci.* 97: 193-202 • Solanes, X., Reixach, J., Tor, M., Tibau, J. & Estany, J. 2009. *Liv. Sci* (en prensa).

Agradecimientos: Proyecto financiado por el MEC (AGL2006-01243). Agradecemos a Teresa Giró y Anna Naco su ayuda en los análisis de laboratorio y al equipo de Selección Batallé su cooperación en el experimento.

RESPONSE TO SELECTION AGAINST BACKFAT THICKNESS AT RESTRAINED INTRAMUSCULAR FAT CONTENT IN DUROC PIGS

ABSTRACT: A selection experiment aimed at decreasing backfat thickness (GD) at restrained intramuscular fat content (GIM) is presented. Pigs were selected according to the mid-parent (litter) breeding values for GD at 180 days and for GIM content in the *gluteus medius* adjusted for carcass weight. Pigs in group S (n=172) were selected against GD while pigs in group C (n=188) were randomly chosen. GIM was maintained similar between groups. Pigs in group S had less GD at 180 days than pigs in group C (16.2 vs. 17.8 mm, p<0.05). No significant difference was found between groups for IMF content and fatty acid composition, both in *gluteus medius* and *longissimus dorsi*. However, pigs from group S had lower body weight at 180 days than pigs from group C (103.3 vs. 106.4, p<0.05). The results of the experiment indicate that selection against GD at restrained IMF can be a good strategy for decreasing GD while keeping GIM fixed but caution should be taken to not decrease body weight.

Keywords: *Intramuscular fat; selection; pigs*

PLAN DE IMPLANTACIÓN DE LA SELECCIÓN GENÓMICA EN LA POBLACIÓN DE VACUNO DE LECHE EN ESPAÑA.

González-Recio, O. ¹, Carabaño, M.J. ¹, Pena, J. ², Díaz, C. ¹, Ugarte, E. ³ y Alenda, R. ⁴

¹Departamento de Mejora Genética Animal. Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria. Ctra. La Coruña km 7,5. 28040 Madrid.

²CONAFE, Ctra Andalucía km 23,6. Valdemoro. 28340 Madrid.

³NEIKER-Tecnalia. Granja Modelo de Arkaute. Apto 46. E-01080. Vitoria-Gasteiz (ARABA).

⁴Departamento de Producción Animal. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid.

Correo electrónico: gonzalez.oscar@inia.es

INTRODUCCIÓN

Hasta ahora, la selección tradicional basaba sus predicciones en dos fuentes de información: la información fenotípica y la genealógica. Recientemente, ha sido posible la incorporación de la información genómica en la selección genética, lo que se ha denominado como **selección genómica**. La posibilidad de genotipar individuos para un gran número (50K) de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a un precio por individuo asequible permite un mayor conocimiento del genoma. Este nuevo escenario está basado en los estudios de asociación con genoma completo, haciendo uso de los genotipados de individuos además de las fuentes tradicionales de información. Estos estudios permiten profundizar en el conocimiento de los caracteres cuantitativos, ya que en su expresión intervienen una gran cantidad de genes, interacciones y procesos biológicos y fisiológicos. Además mejoran la fiabilidad de las evaluaciones genéticas, disminuyen el intervalo generacional y permiten aumentar la intensidad de selección, lo que conlleva un aumento significativo del progreso genético. El vacuno de leche ha sido una de las primeras especies que ha empezado a trabajar en esta dirección y numerosos países disponen de los genotipos de sus animales y han realizado, o tienen previsto realizar durante este año, la primera evaluación con información genómica (Interbull, 2009). Cualquier país que quiera permanecer competitivo en la mejora genética del vacuno de leche deberá incorporar la selección genómica en sus evaluaciones y adaptar sus esquemas de selección.

El objetivo de este trabajo es describir el plan de actuación propuesto para incorporar la selección genómica en el vacuno de leche en España, de forma que los organismos implicados tomen sus decisiones, y que pueda servir de referencia en aquellas poblaciones que se planteen la inclusión de la información genómica en sus programas de mejora.

PLAN DE ACTUACIÓN

La implantación de la selección genómica a nivel nacional, requiere una unión de fuerzas y conocimiento en investigación, desarrollo y aplicación al sector por parte de todos los sujetos implicados. La Confederación de Asociaciones de Frisona Española (CONAFE), los tres centros de Inseminación artificial (ASCOL, XENETICA FONTAO y ABEREKIN), y los centros de investigación del INIA y la UPM están dispuestos a abordar conjuntamente un plan de actuación para poder implementar la selección genómica en España. El desarrollo del plan de actuación pasaría por diferentes etapas, y diferentes estrategias en machos y en hembras. La selección genómica en hembras tiene un planteamiento ligeramente diferente, dado que el coste de genotipado no es económicamente rentable en las explotaciones comerciales, y que el valor genético de las hembras conlleva una menor fiabilidad que la de los machos. Sin embargo, la información genómica ofrece grandes posibilidades en la población de hembras que no deben menospreciarse. Por ejemplo, los efectos genéticos no aditivos (epistasia, dominancia) son más fáciles de identificar en las hembras ya que se dispone de su propio fenotipo. El genotipo de los padres sólo nos proporciona información de la mitad del efecto

aditivo, sin información sobre el efecto de la recombinación ni de la segregación mendeliana. Además los efectos no aditivos pueden explotarse en las vacas comerciales.

Etapa 1.: Genotipado

La plataforma desarrollada por Illumina Ltd (bovine beadchip 50K) es actualmente la más utilizada y la que ofrece mejores resultados. Esta plataforma es capaz de genotipar 50.000 SNPs, distribuidos homogéneamente a lo largo del genoma bovino. El genotipado en machos podría realizarse en aproximadamente 2000 toros con prueba de progenie en España y con muestra de ADN o semen disponible.

En hembras, dado el alto coste del genotipado, sería necesario realizar un genotipado secuencial (Lowe et al., 2004). Se escogería una pequeña población de referencia, (e.g. 1000 - 1500 vacas) que fuese representativa de la población Holstein española y en rebaños que cumplan unos requisitos en cuanto al manejo, tamaño, estructuras familiares y varianzas fenotípicas y genéticas, para aumentar el poder estadístico de los análisis. Esta pequeña población se genotiparía con la misma plataforma que para los machos.

Etapa 2.: Estudios de asociación y evaluaciones genómicas

-vía machos.- Una vez obtenido el genotipado, a través de la colaboración entre CONAFE, INIA y UPM, se realizarán las valoraciones genómicas, que podrían combinarse a su vez con las valoraciones genéticas tradicionales. Actualmente, no existe un consenso sobre cuál es el método óptimo para realizar las evaluaciones genómicas. Las regresiones lineales Bayesianas (Bayes A y Bayes B, Meuwissen et al., 2001; *Bayesian Lasso*, Park y Casella, 2008), y los métodos semi-paramétricos (Gianola et al. 2006; Gonzalez-Recio et al., 2008) destacan entre los modelos más atractivos en selección genómica en especies domésticas. La investigación que aborde la fiabilidad y precisión de las evaluaciones genómicas, así como su habilidad predictiva, es de principal interés para su posible implementación en el futuro.

-vía hembras. En las hembras sería imprescindible realizar previamente estudios de asociación con genoma completo, para detectar las regiones genómicas que estén asociadas a los caracteres de interés. El conocimiento de estas regiones ayudaría a reducir el espacio muestral, detectando sólo aquellos SNPs a lo largo del genoma que sean informativos y al mismo tiempo no redundantes. Los métodos de *machine learning* (teoría de la información; Cover y Thomas, 1991; *bagging*; Breiman, 1996) y el *lasso* son atractivos para desarrollar este objetivo. Sería necesario calcular la habilidad predictiva de los SNPs seleccionados con cada método y con diferente número de SNPs seleccionados. La reducción de SNPs genera una reducción importante del coste del genotipado.

Cabe poner en duda que los SNPs seleccionados en los machos sean los más aconsejables para seleccionar en hembras. Se estudiará la selección de SNPs con la información de los machos y se compararán los resultados.

Etapa 3.: Implementación en los programas de mejora

-vía machos. Los centros de IA podrán adaptar sus estrategias de testaje al nuevo escenario (Van Raden et al., 2009), y podrán reducir significativamente el intervalo generacional (Schaeffer, 2006). Los centros de IA podrán incorporar el genotipado de hembras para utilizar la selección genómica en las madres de sementales.

-vía hembras. Un estudio económico proporcionaría el número de SNPs más rentable a genotipar, para maximizar los beneficios de la selección genómica. Una vez determinado que SNPs se genotiparían, se desarrollaría un chip adaptado de baja densidad y menor coste que podría ser utilizado en las granjas comerciales para tomar decisiones de selección en la etapa de la cría, y los centros de IA podrían realizar una preselección a gran escala de hembras candidatas a madres de sementales. Las vacas resultantes de esta preselección podrán ser adquiridas por el centro u ofertadas por el ganadero tras ser genotipadas con un chip completo. Posibles variaciones de este esquema podrían surgir a medida que se avance en el conocimiento de la selección genómica.

FUTURO

La selección genómica abre nuevas puertas al conocimiento de la arquitectura genética de los caracteres complejos, al mismo tiempo que mejora la respuesta genética en las poblaciones domésticas de interés económico. La implantación de la selección genómica en el vacuno lechero de España conllevaría numerosas ventajas frente a la selección tradicional que se está realizando hasta la fecha, empezando por un importante incremento de la respuesta genética. Además, el conocimiento del genotipo de machos y hembras permitiría implementar programas de acoplamiento a nivel genómico, buscando las combinaciones de alelos que produzcan mayor beneficio en las poblaciones comerciales. Debido a la menor fiabilidad de las pruebas de las hembras que de los machos, el salto proporcional en incremento de fiabilidad sería mucho mayor en hembras, a pesar de que la fiabilidad siguiese siendo menor.

El futuro de la genómica ha pasado de ser prometedor a ser una realidad, al menos en el vacuno de leche, y a medida que se avance en el conocimiento del genoma, nuevos retos difíciles de prever pueden aparecer en escena.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Breiman, L. 1996. *Machine Learning* 24: 123–140. ● Gianola D., Fernando R.L., Stella A. *Genetics* 173 (2006) 1761-1776. ● Gonzalez-Recio O., D. Gianola, N. Long, K.A. Weigel, G.J.M. Rosa, S. Avendaño. 2008. *Genetics* 178: 2305-2313. ● Interbull, 2009. *Genomic Selection Workshop* (Uppsala, Suecia, 26-28 Enero, 2009). ● Meuwissen, T. H. E., B.J. Hayes, M.E. Goddard. 2001. *Genetics* 157: 1819-1829. ● Lowe CE et al. 2004. *Genes. Immun.* 5: 301-305. ● Park T, Casella G. 2008. *J. Am. Stat. Assoc.* 103 (482): 681-686. ● Schaeffer L.R. 2006. *J. Anim. Breed. Genet.* 123 (4): 218-223. ● Cover, T.M., J.A. Thomas. 1991 *Elements of information theory.* John Wiley and sons, New York. ● VanRaden, P. M., C. P. Van Tassell, G. R. Wiggans, T. S. Sonstegard, R. D. Schnabel, and F. Schenkel. 2009. *J. Dairy Sci.*, (en prensa).

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo de los centros de inseminación artificial ABEREKIN, ASCOL y XENETICA FONTAO.

PLAN TO IMPLEMENT GENOMIC SELECTION IN THE SPANISH HOLSTEIN POPULATION

ABSTRACT: The new genomic era raises interesting challenges in dairy cattle, and many aspects have to be reconsidered in both research and application fields. Spanish dairy industry has to implement genomic-assisted evaluations and adapt their breeding schemes to incorporate genomic selection to keep being competitive. This communication shares the implementation plan that different research and industry institutions are developing. The plan involves three different stages: 1. Genotyping; 2. Genome-wide association studies and genome-assisted evaluations; 3. Implementation. These stages should have different strategies regarding its application on the male or female populations. New knowledge from research and new genomic tools that might be available in the future will bring answers to some of the questions that have appeared in the genomic era.

Keywords: *genomic selection, Spanish Holstein*

DETECCION DE SNPs REDUNDANTES EN GENOTIPADOS DE ALTA DENSIDAD Y USO DE BAGGING PARA INCREMENTAR LA PRECISIÓN EN LA PRE-SELECCIÓN DE SNP PARA LA SELECCION GENOMICA

González- Recio, O. ¹, Naya, H. ², Weigel, K. A. ³, Gianola, D. ⁴ y Rosa, G.J.M. ³

¹Departamento de Mejora Genética Animal. Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria. Ctra. La Coruña km 7,5. 28040 Madrid.

²Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

³Dairy Science department. University of Wisconsin-Madison. 53076 WI,USA.

⁴Animal Science department. University of Wisconsin-Madison. 53076 WI,USA.

Correo electrónico: gonzalez.oscar@inia.es

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de genotipar animales para una gran cantidad de SNPs a lo largo del genoma ha generado un gran interés para su aplicación en la selección animal. Sin embargo, estas nuevas tecnologías genotipan una gran cantidad de SNPs, que sobrepasan el número de individuos genotipados, lo que hace que los modelos tradicionales no sean efectivos bajo estas circunstancias. En los últimos años se han propuesto diferentes estrategias para abordar la sobreparametrización de estos modelos. Caben destacar los modelos Bayesianos jerarquizados en los que se asumen varianzas específicas a priori para los efectos o varianzas de los SNPs (e.g. Meuwissen et al., 2001; Gianola et al., 2003). Sin embargo, la mayoría de estos modelos adolecen de supuestos demasiado estrictos, o de severas distribuciones a priori que no permiten el aprendizaje Bayesiano. Los métodos no paramétricos y de machine learning (Gianola et al., 2006) permiten analizar datos con ruido, redundancia, e inconsistencias, ya que la función que relaciona los datos con las covariables es inespecífica.

En este trabajo se evalúan dos nuevas estrategias de machine learning aplicadas a la selección genómica para reducir la dimensionalidad y colinearidad de los genotipos, y para mejorar la habilidad predictiva del método.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron las evaluaciones genéticas de vida productiva (VP) y el genotipo (Illumina® BovineSNP50 BeadChip) de 3305 sementales Holstein con prueba de progenie en Estados Unidos, que fueron cedidos por el Laboratorio de Genómica funcional bovina y los programas de mejora animal del USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center (Beltsville, MD). Tras la edición de los genotipos y la imputación de los genotipos faltantes, se usó un total de 32,611 SNPs en los análisis. Se seleccionaron los sementales transmisores de baja o alta VP, correspondientes a los machos por debajo del percentil α y por encima del percentil $(1 - \alpha)$, respectivamente, para sus PTA de VP, simulando estudios caso-control. El grupo transmisor de alta VP es susceptible de poseer genes favorables para los caracteres de producción, morfológicos y resistencia a enfermedades.

La detección de SNPs se realizó usando machine learning, en concreto bagging con criterios de teoría de la información.

Bagging

El método bagging (de las siglas en inglés bootstrap aggregating) fue descrito inicialmente por Breiman (1996). Supongamos $\Psi = (\mathbf{c}, \mathbf{X})$ es el grupo de machos pertenecientes a las clases (\mathbf{c}) de alta y baja VP con sus respectivos genotipos (\mathbf{X}). Se realizó un muestreo aleatorio con reposición (bootstrapping) para cada una de las clases por separado, de manera que cada (c_i, \mathbf{x}_i) puede aparecer más de una vez o ninguna en cada subset $\Psi^{(B)}$. Se realizaron 150 réplicas de bootstrapping utilizando los percentiles $\alpha=(0.10, 0.15, 0.20)$ en iguales proporciones, y se calculó la ganancia de información (IG) de cada SNP en cada $\Psi^{(B)}$, de tal

forma que se obtuvo $\phi_B = (IG_{b1}, IG_{b2}, \dots, IG_{bp})$, $B=1-150$, donde IG_{bi} es la IG del SNP i en la muestra de bootstrapping b .

Detalles sobre el cálculo de IG pueden encontrarse en Long et al. (2007).

La IG para cada SNP procedente del bagging se calculó como la media de las 150 réplicas de bootstrapping.

Eliminación de redundancia

La redundancia entre pares de SNPs se estimó a través de la información mutua, que mide la cantidad de información que comparten dos variables aleatorias (Cover y Thomas, 1991). La información mutua entre dos SNPs, $MI(S_i, S_j)$, se define como:

$$MI(S_i; S_j) = \sum_{s_i, s_j} P_{S_i, S_j}(s_i, s_j) \log \frac{P_{S_i, S_j}(s_i, s_j)}{P_{S_i}(s_i)P_{S_j}(s_j)},$$

donde $P_{S_i}(s_i)$ y $P_{S_j}(s_j)$ son las distribuciones marginales y $P_{S_i, S_j}(s_i, s_j)$ es la distribución de probabilidad conjunta. A menor información mutua, mayor independencia entre las variables (SNPs). Se consideró que dos SNPs son redundantes si su MI > 0.37 (percentil 95).

Se seleccionaron los 2000 SNPs con mayor IG. A partir de estos, se seleccionó otro set de 2000 SNPs, procediendo de la siguiente forma: si entre los 2000 SNPs existía un par redundante, se eliminó el SNP con menor IG, sustituyéndolo por el siguiente SNP de la lista completa con mayor IG. Se procedió iterativamente hasta que se eliminaron todos los SNPs redundantes en los 2000 seleccionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la MI de pares de SNPs en el mismo cromosoma, en función de su distancia en pares de bases. Como era de esperar, la mayor redundancia se observa entre SNPs más próximos, aunque como se observa en la figura, proximidad no necesariamente conlleva redundancia, probablemente debido a diferentes frecuencias alélicas o mayor desequilibrio de ligamiento. La tabla 1 muestra el número de SNPs por cromosoma entre los 2000 con mayor IG, antes y después de aplicar la eliminación de redundancia. Se observa una reducción importante del número de SNPs en aquellos cromosomas más informativos, puesto que contienen SNPs informativos pero redundantes entre si. Esta eliminación de redundancia provoca la entrada de nuevos SNPs en cromosomas menos informativos, pero con SNPs que confieren una IG suficiente como para ser seleccionados. Las diferencias son más notables cuando se reduce el número de SNPs seleccionados. La figura 2 muestra el ejemplo de dos importantes cromosomas (BTA2 y BTA14) en los que previamente se han detectado genes relacionados con la vida productiva (Grisart et al., 2004; Schnabel et al., 2005). El 21 % de los SNP seleccionados después de eliminar redundancia fue diferente a los 2000 SNPs iniciales.

La pre-selección de SNPs aporta ventajas en los estudios de asociación y la selección genómica, puesto que permite reducir la dimensionalidad del problema y detectar aquellas regiones de interés en la expresión del carácter. Además permite el diseño de SNPs de baja densidad, que permiten genotipar individuos a un menor coste y con una buena capacidad para predecir observaciones futuras (Long et al.; 2007; González-Recio et al., 2008; Weigel et al., 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo animan a un estudio más profundo sobre el comportamiento y habilidad predictiva de estos métodos en estudios de asociación con genoma completo y valoraciones genómicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Breiman, L, 1996. Machine Learning 24: 123–140.
- Gianola, D et al. 2006. Genetics 173: 1761-1776.
- Gianola D. et al. 2006. Genetics 173:1761-1776.
- Gonzalez-Recio O. et al. 2008.

Genetics 178: 2305-2313. • Grisart B. et al. 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101:2398-403. • Long, N. et al. 2007. J. Anim. Breed. Genet., 124 (6): 377-389. • Meuwissen, T. H. E. et al. 2001. Genetics 157: 1819-1829. • Schnabel et al. 2005. Animal Genetics, doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01337.x • Cover, T.M. & J.A. Thomas. 1991. Elements of information theory. John Wiley and sons, New York. • Weigel K. A. et al. J. Dairy Sci. (submitted).

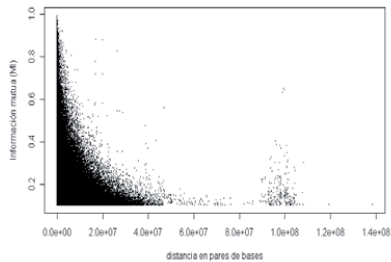


Figura 1. Información mutua entre pares de SNPs en función de la distancia en pares de bases

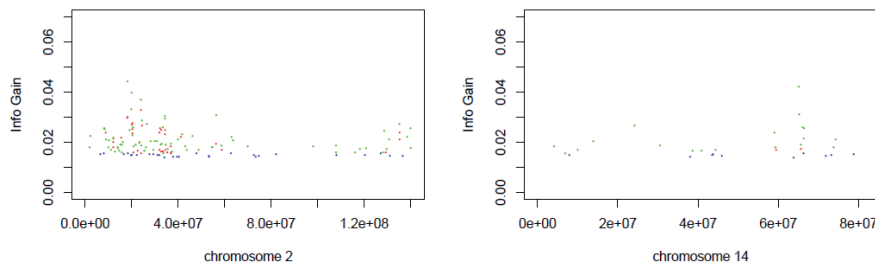


Figura 2. SNPs seleccionados antes y después de considerar redundancia (verde), SNPs redundantes eliminados (rojo) y SNPs seleccionados después de eliminar redundancia (azul) para los cromosomas bovinos 2 y 14.

REDUCTION OF COLINEARITY IN HIGH-DENSITY SNPs GENOTYPES, AND USE OF BAGGING TO INCREASE ACCURACY OF PRE-SELECTION OF SNPs IN GENOMIC SELECTION

ABSTRACT. Machine learning provides tools to deal with crude, noisy, inconsistent and redundancy genomic data from high throughput assays for dense genotyping. This work provides preliminary results from two novel methods to reduce redundancy and increase accuracy in genome-wide association studies and genomic selection. Mutual information theory detects redundant SNPs from high-density SNP assay. The bootstrap aggregating method (bagging) increases accuracy of feature selection. The combination of these two methods might create a proper scenario for a higher predictive ability using low dense SNP assays, and should be investigated further in the future.

Keywords: theory information, bagging, snp, genomic selection.

SELECCIÓN DE REPRODUCTORES BASADA EN EL GENOTIPO DEL GEN MC1R EN LAS RAZAS EQUINAS ASTURCÓN Y MALLORQUÍN

Royo, L.J.¹, Álvarez, I.¹, Pérez-Pardal, L.¹, Fernández, I.¹, Rincón, C.¹, Lorenzo, L.², Payeras, L.³, Gutiérrez, J.P.⁴ y Goyache, F.¹

¹SERIDA-Somió, C/ Camino de los Claveles 604, 33203-Gijón (Asturias), e-mail: ljroyo@serida.org; ² ACPRA, Centro Ecuestre El Asturcón 33194-Oviedo (Asturias); ³ AECABMA, Plaça des Blanquer, 46 Inca-07300 (Illes Balears); ⁴Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid

INTRODUCCIÓN

El color de la capa es un carácter zootécnico sobre el que se lleva a cabo una intensa selección. Algunas asociaciones de ganaderos no permiten la presencia de una determinada capa en los animales inscritos en sus libros genealógicos. En otras, el valor del animal está muy determinado, tanto por el color de la capa, como incluso por la fórmula genotípica. La fórmula genotípica se tiene en cuenta para diseñar los cruzamientos posibles y recomendables, y de esta manera conseguir combinaciones de alelos que permitan capas determinadas con mayor o menor probabilidad.

Las asociaciones de ganaderos ACPRA (Asociación de Criadores de Ponis de Raza Asturcón) y Associació de Criadors i Propietaris de Cavalls de Pura Raça Mallorquina, llevan a cabo una selección en contra del carácter alazán. Este carácter solo se expresa cuando el alelo alazán está en homocigosis, por eso los criadores están muy interesados en identificar a los reproductores que puedan ser portadores de este alelo. Se han descrito dos alelos que afectan al color de la capa y que en homocigosis producen la capa alazana (Marklund et al., 1996, Wagner y Reissmann, 2000). Ambos alelos tienen mutaciones que provocan la aparición de un codon stop prematuro en la traducción a proteína, lo que provoca que el receptor Mc1r, esté inactivado, y como consecuencia que los melanocitos del individuo solo sinteticen melanina rojiza (*pheomelanina*).

En el proyecto MICINN-INIA RZ2008-00010, se pretende valorar si las pérdidas de diversidad genética que se están produciendo en estas razas, ambas de censo reducido, por el hecho de seleccionar a los reproductores teniendo en cuenta el genotipo del Mc1r, son asumibles dentro de la situación particular de cada raza.

MATERIAL Y MÉTODOS

237 individuos, pertenecientes a la cría de los años 2007 y 2008, de las razas Asturcón de capa castaña (159) y Mallorquín (78) fueron genotipados para la presencia de los SNP descritos en el gen Mc1r, y que son responsables en homocigosis de la capa alazana. El genotipado se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Royo et al., (2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las dos razas se detectaron individuos portadores del alelo alazán, en un 25,8 % en el mallorquín, y en casi un 40 % en el Asturcón castaño. Además, en el asturcón castaño, se detectó el segundo alelo alazán, que hasta el momento solo había sido descrito en la raza alemana *Schwarzwalder Kaltblut* (*Black Forest breed*) (Wagner et Reissmann, 2000). El alelo alazán, y en el caso del asturcón castaño los alelos alazanes, se encuentran segregando en las dos poblaciones estudiadas pese a la selección existente en contra de la capa alazana. El carácter recesivo y el bajo número de descendientes por animal reproductor, ha hecho muy difícil la identificación de los animales portadores del carácter antes de la utilización de herramientas genéticas.

Se va a estimar la variabilidad genética de cada una las poblaciones utilizando marcadores tipo microsatélite. Además se estimarán las pérdidas adicionales de variabilidad genética que se producirían al eliminar del esquema de selección los animales portadores del alazán. Con estos datos se elaborarán estrategias de selección, basadas en recomendaciones de cruzamientos, para compatibilizar la minimización de las pérdidas de variabilidad genética con la selección en contra del alelo alazán.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Marklund, L., Johansson Moller, M., Sandberg, K. & Anderson L. 1996. Mamm. Genome 7:895–899.
- Royo, L.J., Fernández, I., Azor, P.J., Álvarez, I., Pérez-Pardal, L. & Goyache, F. 2008. J. Anim Sci. 86: 1291-1294.
- Wagner, H.-J. & Reissmann, M. 2000. Anim. Genet. 1:289–290.

Agradecimientos: Este trabajo se enmarca dentro del proyecto MICINN-INIA RZ2008-00010. Los autores agradecen la colaboración de las asociaciones de ganaderos ACPRA (<http://www.asturcones.com/>) y Associació de Criadors i Propietaris de Cavalls de Pura Raça Mallorquina.

SELECTION OF REPRODUCTIVE INDIVIDUALS BASED ON MC1R GENOTYPE IN THE ASTURCON AND MALLORQUIN HORSE BREEDS

ABSTRACT: Coat colour is a significant selective trait. Some horse coat colours are not allowed in the studbooks depending on the breed, or sometimes the price of an individual depends on its coat or even on its genotypic formulae. ACPRA (Asociación de Criadores de Ponis de Raza Asturcón) and the Associació de Criadors i Propietaris de Cavalls de Pura Raça Mallorquina, don't allow chestnut coated individuals in theirs studbooks, so, due to the recessive inheritance of the trait, the development of molecular test intended to identify individuals carrying the chestnut allele became important. In this work, we show the identifications of individuals carriers of chestnut alleles in the two breeds: 25.8% of the analysed Mallorquín individuals and 40% of the Asturcón individuals. The two chestnut alleles were identified in Asturcón. Strategies to estimate loose of genetic variability due to the elimination of these reproductive individuals, as well as whether they can be assumed in the context of each breed, are also the aims of the MICINN-INIA RZ2008-00010 project.

Keywords: *Mc1r*, *Extension locus*, *Asturcón*, *Mallorquín*

Tabla 1. Genotipos del gen *Mc1r* de los individuos agrupados por raza y capa.

Raza	Mallorquín				Asturcón Castaño								
Capa	Negra		Negra		Castaña Oscura		Castaña			Castaña Clara		Parda	
Genotipo	E/E	E/e1	E/E	E/e1	E/E	E/e1	E/E	E/e1	E/e2	E/E	E/e1	E/E	E/e1
N	62	16	10	6	18	8	57	32	6	3	6	11	2
			16		26		95			9		13	
Total	78				159								

HAPLOGRUPOS DEL CROMOSOMA Y EN LA CABRA BERMEYA DE ASTURIAS Y OTRAS RAZAS ESPAÑOLAS.

Royo, L.J. ¹, Pérez-Pardal, L. ¹, Azor, P.J. ², Álvarez, I. ¹, Rincón, C. ¹, Fernández, I. ¹, Guerra, V. ³, Gutiérrez, J.P. ⁴ y Goyache, F. ¹

¹SERIDA-Somió, C/ Camino de los Claveles 604, 33203-Gijón (Asturias), e-mail: fgoyache@serida.org; ²Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, 14071 Córdoba; ³ACRIBER (<http://www.cabrabermeya.com/>), 3355-Poo de Cabrales s/n (Asturias), ⁴Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid

INTRODUCCIÓN

Mediante la secuenciación de fragmentos de los genes AmelY y ZFY, Pidancier et al. (2006) identificaron 3 haplogrupos en el cromosoma Y de la cabra doméstica (*Capra hircus*). Dos de ellos (C1 y C2) son los más frecuentes y están ampliamente distribuidos por todo el mundo (Europa, Asia y África) sin que exista estructura geográfica; el tercero (C3) es muy raro (Pidancier et al., 2006). En el trabajo de Pidancier et al. (2006), único estudio realizado hasta el momento sobre diversidad en el cromosoma Y de cabras, sólo se incluyeron 7 muestras de la Península Ibérica, 2 de ellas de España.

La cabra Bermeya es una población de gran importancia histórica y cultural en el ámbito asturiano que se encuentra en grave recesión debido al despoblamiento rural y a la introducción, en el Oriente de Asturias, de animales de tipo Pirenáico (Figueroa et al., 2003). La cabra Bermeya se explota en dos subpoblaciones geográficas, Oriental y Occidental, que se encuentran en aislamiento reproductivo desde, al menos, el último tercio del siglo XX y que presentan notables diferencias productivas y de tipo (Álvarez et al., 2008). El objetivo de este trabajo, es realizar una evaluación preliminar de la diversidad genética en el cromosoma Y de las dos subpoblaciones de cabra Bermeya de Asturias utilizando los SNP descritos por Pidancier et al., 2006. Un conjunto de individuos de otras razas caprinas españolas se utilizará como referencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

De manera análoga a lo descrito en Royo et al. (2008) para el diagnóstico de las variantes del color de la capa de los caballos, se han diseñado 3 protocolos de RT-PCR acoplado a sondas fluorescentes, para amplificar 2 fragmentos del gen AmelY y uno del gen ZFY. Estos protocolos permiten el diagnóstico de 3 SNP que, en conjunto, permiten diferenciar los 4 haplogrupos descritos por el momento en el cromosoma Y del género *Capra* (Pidancier et al., 2006). Los oligonucleótidos y sondas se diseñaron con el software Beacon Designer version 2.0 (Bio-Rad, Barcelona) y se sintetizaron por Sigma-Genosys (Haverhill, UK) y Eurogentec (Liege, Bélgica). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el iCycler iQ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La Tabla 1 describe las sondas y condiciones PCR utilizadas.

Se han genotipado muestras de machos de 6 razas autóctonas españolas (Bermeya, 38; Blanca Andaluza, 6; Guadarrama, 13; Malagueña, 2; Murciano Granadina, 23; Payoya, 3) además de una muestra de macho de cabra montés de la Sierra de Gredos (*Capra pyrenaica*), lo que hace un total de 86 muestras analizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para los 3 SNP estudiados y el haplogrupo al que pertenece cada muestra se muestran en la Tabla 2. Solamente se detectaron los dos haplogrupos más comunes en cabra doméstica, denominados C1 y C2 por Pidancier et al. (2006). El haplogrupo C1 es ampliamente mayoritario en la muestra analizada y único en todas las

razas estudiadas, excepto la Bermeya en sus dos subpoblaciones geográficas y la Malagueña, donde aparece el haplogrupo C2. El cromosoma Y del individuo salvaje (*Capra pyrenaica*) también se asignó al haplogrupo C2.

Los análisis de los orígenes de las poblaciones de cabra doméstica en España utilizando ADN mitocondrial señalan una situación similar al que ahora se identifica en la línea paterna: la existencia de dos haplogrupos, uno mayoritario y otro raro. En concordancia con Luikart et al. (2001), Amills et al. (2004) y Azor et al. (2005) describieron la existencia de un haplogrupo mitocondrial mayoritario (A) en las cabras españolas, con apenas unas pocas ejemplares con un segundo haplogrupo (C) minoritario (Azor et al., 2005), encontrado en razas caprinas del sur de la Península Ibérica. Recientemente, se han encontrado animales de la subpoblación occidental de la raza Bermeya con el haplogrupo C, lo que parece indicar que su distribución puede ser más amplia de lo inicialmente pensado (Royo et al., 2009).

Los resultados preliminares que se presentan en esta comunicación indican una heterogeneidad en los orígenes del ganado caprino de España. Esta heterogeneidad sería identificable tanto en la línea materna como paterna. Los SNP utilizados son un indicador importante de la diversidad del cromosoma Y caprino, pero probablemente insuficiente para apoyar o rechazar la hipótesis de un origen múltiple de la cabra doméstica por la vía paterna. En futuros análisis, se pretende evaluar la variabilidad genética dentro de haplogrupos, añadiendo la información proveniente del polimorfismo de microsatélites específicos del cromosoma Y caprino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, I., Royo, L. J., Fernández, I., Gutiérrez, J. P., Pérez-Pardal, L., Guerra, V., Rincón, C., Traoré, A. & Goyache F. 2008. ITEA 104: 290-294.
- Amills, M., Capote, J., Tomàs, A., Kelly, L., Obexer-Ruff, G., Angiolillo, A. & Sanchez, A. 2004. J. Dairy Res. 71: 257-262.
- Azor, P.J., Monteagudo, L.V., Luque, M., Tejedor, M.T., Rodero, E., Sierra, I., Herrera, M., Rodero, A. & Arruga, M.V. 2005. Anim. Genet. 36: 423–5.
- Figueroa, P., Fernández, I., Gómez, E., Royo, L.J., Álvarez, I. & Goyache, F. 2003. AGRÍ 33: 57-71
- Luikart, G., Gielly, L., Excoffier, L., Vigne, J. D., Bouvet, J. & Taberlet, P. 2001. PNAS 98: 5927–5932.
- Pidancier, N., Jordan, S., Luikart, G. & Taberlet, P. 2006. Mol. Phyl. Evol. 40: 739–49.
- Royo, L.J., Fernández, I., Azor, P.J., Álvarez, I., Pérez-Pardal, L. & Goyache, F. 2008. J. Anim Sci. 86: 1291-1294
- Royo, L.J., Traoré, A., Tambourá, H.H., Álvarez, I., Kaboré, A., Fernández, I., Ouédraogo-Sanou, G., Toguyeni, A., Sawadogo, L. & Goyache, F. 2009. Anim. Genet. doi:10.1111/j.1365-2052.2008.01828.x

Agradecimientos: Este trabajo se enmarca dentro de los proyectos MEC-INIA RZ07-00002, CGL2005-03761/BOS y CGL2008-03949/BOS. Los autores agradecen la total colaboración de los socios de ACRIBER (<http://www.cabrabermeya.com>).

Y-CHROMOSOME HAPLOGROUPS IN THE BERMEYA GOAT OF ASTURIAS AND OTHER SPANISH GOAT BREEDS.

ABSTRACT : Here we present preliminary results on the assessment of the Y-chromosome diversity in Spanish goat, particularly focusing on the rare Bermeya goat breed. Three SNPs previously identified on the caprine AmelY and ZFY genes were genotyped using a RT-PCR protocol designed ad-hoc. Sample genotyped included 38 Bermeya males (20 from the Eastern and 18 from the Western subpopulations), 13 males from the Guadarrama breed, 2 from the Malagueña breed, 23 from the Murciano-Granadina, 6 from the Blanca Andaluza and 3 from the Payoya breed. Two different haplogroups were identified: C1, which was predominant in our sample, and C2 which was present in 3 Bermeya males belonging to both

the Eastern and the Western subpopulations as well as in one Malagueña. The present analysis will be the basis of further characterisation of Y-chromosome diversity in Spanish goat using Y-specific microsatellite polymorphism.

Keywords: Y chromosome, SNP, goat.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores, y sondas utilizados en los protocolos de RT-PCR. También se muestra el tamaño de los amplicones y los marcajes de cada una de las sondas utilizadas.

Molécula	Reporter 5'	Sequence 5'-3'	Quencher 3'	Tamaño
Cebadores				
AmelY1-up		AGCCTCATCACCACATC		102 pb.
AmelY1-dn		GTTGGATTGGAGTCATGG		
AmelY2-up		CATGGTGCCAGCTCAG		87 pb.
AmelY2-dn		TGGTGTGGATTGGAGTC		
ZFY2-up		AGGTTTATGAATGTTTTCCC		75 pb.
ZFY2-dn		CGATTAATAACATGAAGCAG		
Sondas				
AmelY1-C	6-FAM	TGCCAGCTCAGCAGCCTG	BHQ-1	
AmelY1-T	Texas Red	TGCCAGCTTAGCAGCCTG	BHQ-2	
AmelY2-A	HEX	TACCCCAGCAAACAATGATGCC	BHQ-1	
AmelY2-C	Cy5	TACCCCAGCAACCAATGATGCC	BHQ-2	
ZFY2-A	HEX	CTAAGCAAGTATGGCTTTCAA	BHQ-1	
ZFY2-G	Cy5	CTAAGCAAGTGTGGCTTTCAA	BHQ-2	

Tabla 2. Número de muestras, genotipos y haplotipos correspondientes de cada una de las razas utilizadas.

Raza	Genotipo			Haplotipo	N
	AmelY-1	AmelY-2	ZFY-2		
Bermeya Oriente (20)	C	C	G	C1	19
	C	C	A	C2	1
Bermeya Occidente (18)	C	C	G	C1	16
	C	C	A	C2	2
Blanca Andaluza (6)	C	C	G	C1	6
Guadarrama (13)	C	C	G	C1	13
Malagueña (2)	C	C	G	C1	1
	C	C	A	C2	1
Murciano-Granadina (23)	C	C	G	C1	23
Payoya (3)	C	C	G	C1	3
Montés-Gredos (1)	C	C	A	C2	1

VARIABILIDAD DE LOS GENES DEL COLOR DE LA CAPA EN EL GANADO CAPRINO

Badaoui, B.¹, Capote, J.², Jordana, J.¹, Ferrando, A.¹, Vidal, O.³, Martínez, A.⁴, Delgado, J. V.⁴, D'Andrea, S.⁵, Pilla, F.⁵ y Amills, M.¹.

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; ² Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna 38108, Tenerife;

³ Departament de Biologia, Universitat de Girona, Girona 17071; ⁴ Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba 14071; ⁵ Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise, Campobasso, Italia.

E-mail de contacto: Bouabid.Badaoui@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La pigmentación de la capa en mamíferos depende fundamentalmente del número de melanocitos y de sus niveles de actividad melanogénica (Sturm et al., 2001). Existen dos tipos de melanina: la eumelanina, que da lugar a capas negras o marrones, y la feomelanina asociada a capas rojas o amarillentas (Sturm et al., 2001). Cuando la actividad de la tirosinasa es elevada se favorece la síntesis de eumelanina, mientras que en el caso contrario se sintetiza preferentemente feomelanina (Sturm et al., 2001). A su vez, la actividad de la tirosinasa está regulada a través de la unión de la hormona estimulante del melanocito α (MSH) al receptor de la melanocortina 1 (MC1R), fenómeno que favorece una mayor actividad de la tirosinasa y por tanto da lugar a la síntesis de eumelanina. En bovino, el gen *MC1R* tiene tres alelos E^D (capa negra), E⁺ (capa marrón) y e, que da lugar a una capa roja (Seo et al., 2007). Por otra parte, el gen Agouti-signaling protein (*ASIP*) es responsable de la síntesis de una molécula que compete con la MSH para unirse con MC1R (Jackson, 1994). La unión de ASIP a MC1R da lugar a la síntesis de feomelanina (Sturm et al., 2001). En bovino, el gen *ASIP* regula la distribución de la pigmentación dorsal y ventral (Seo et al., 2007) mientras que en ovino la duplicación del gen *ASIP* está asociada a la capa de color blanco (Norris y Whan, 2008). Finalmente, las proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TYRP1 y TYRP2) desempeñan una función importante en el proceso de la melanogénesis (Jackson, 1994). En ovino se ha demostrado que la sustitución C290F en la proteína TYRP1 tiene un importante efecto sobre el color de la capa (Gratten et al., 2007). Con el objetivo de abordar el estudio de la determinación del color de la capa en ganado caprino, se ha procedido a caracterizar el polimorfismo de los genes *MC1R*, *ASIP* y *TYRP1* en distintas poblaciones caprinas españolas e italianas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recogida de muestras y extracción de RNA total y DNA genómico

Se ha realizado la extracción de DNA genómico de muestras de pelo/sangre, procedentes de cabras con distintos orígenes y capas, mediante el kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen). Concretamente, se han analizado individuos de las razas Murciano-Granadina, Malagueña, Payoya, Palmera, Majorera, Tinerfeña, Garganica, Jonica, Maltesa, Derivata di Siria, Girgentana y Saanen. Por otra parte, se ha realizado extracciones de RNA total a partir de muestras de piel de cabras Palmeras y Tinerfeñas. Dichas muestras han sido conservadas en RNA-later (Applied Biosystems) a una temperatura de -20 °C. La extracción de RNA total se ha llevado a cabo mediante el kit *RiboPure* (Ambion). La síntesis de DNA complementario se ha realizado con el kit *Thermoscript RT-PCR System* (Invitrogen). Se ha empleado un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) para estimar la cantidad y calidad del RNA total, así como un equipo Nanodrop ND1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) para cuantificar el DNA genómico.

2. Detección de polimorfismos en los genes *MC1R*, *TYRP1* y *ASIP*

Se ha amplificado por PCR prácticamente la totalidad de la región codificante de los genes *MC1R*, *TYRP1* y *ASIP* mediante cDNA sintetizado a partir de RNA de muestras de piel correspondientes a 8 cabras de origen canario (4 de color negro y 4 de color blanco). En

paralelo, se procedió a amplificar, a partir de muestras de DNA genómico, la región codificante y determinadas regiones intrónicas de los tres genes anteriormente citados, empleando para ello un mínimo de cinco individuos de distintas razas y coloraciones. Las condiciones de amplificación y las secuencias de los primers pueden solicitarse al autor responsable de la comunicación. La purificación de la PCR se llevó a cabo mediante el kit *Exo-SAP-IT* (GE Healthcare) después de lo cual se realizó la reacción de secuenciación con el *BigDye Terminator v1.3 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron purificadas mediante el kit *Sequencing Reaction Cleanup* (Millipore) y analizadas con el programa *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un resumen de los resultados obtenidos puede observarse en la Tabla 1. Concretamente, se ha identificado 7 polimorfismos en la región codificante del gen *MC1R*, de los cual 5 son mutaciones no sinónimas. Resulta interesante observar que uno de los polimorfismos genera un codón stop, además, cuatro de los polimorfismos no sinónimos implican la sustitución de un aminoácido por otro de características bioquímicas muy distintas (Lys226Glu y Val249Phe, Gly255Asp, Cys267Tyr). En el gen *ASIP* se ha identificado dos polimorfismos no sinónimos en el exón 3, mientras que en los intrones 1 y 2 se ha detectado dos polimorfismos adicionales. Aunque el análisis de unos pocos individuos apunta al hecho de que los dos polimorfismos no sinónimos tienen efectos sobre el color de la capa, ello debe confirmarse mediante el genotipaje de un número suficiente de individuos. Finalmente, en el gen *TYRP1* se ha hallado dos polimorfismos sinónimos en el exón 6 y 16 polimorfismos en el intrón 2. Actualmente, se está procediendo a genotipar, en un panel de cabras de distintas razas, los diversos polimorfismos no sinónimos caracterizados en el presente trabajo para determinar su asociación con el color de la capa.

Tabla 1. Polimorfismos de los genes relacionados con el color de la capa en caprino

Gen	Polimorfismo	Localización	Naturaleza	Análisis in silico*
MC1R	T/C	Exón 1	Sinónimo	-
	C/T	Exón 1	No-sinónimo (Ala81Val)	0.5
	C/T	Exón 2	Codón stop	-
	A/G	Exón 2	No-sinónimo (Lys226Glu)	0.5
	G/T	Exón 2	No-sinónimo (Val249Phe)	0.95
	G/A	Exón 2	No-sinónimo (Gly255Asp)	0.95
	C/G	Exón 2	No-sinónimo (Cys267Tyr)	0.86
ASIP	T/G	Exón 3	No-sinónimo (Cys126Gly)	0.83
	T/G	Exón 3	No-sinónimo (Val128Gly)	0.57
	G/T	Intrón 1	-	-
TYRP1	G/A	Intrón 2	-	-
	A/G	Exón 6	Sinónimo	-
	A/G	Exón 6	Sinónimo	-
	16 polym	Intron2	-	-

* Un valor > 0.90 indica una elevada probabilidad de que se produzca una alteración funcional, según el programa Panther (Brunham et al. 2005)

Agradecimientos: El presente trabajo se ha financiado mediante los proyectos de conservación de recursos zoogenéticos RZ2007-00005-C02-01 y RZ2007-00005-C02-02 concedidos por el INIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brunham et al. 2005. PLoS Genet 1:739-747.
- Feng et al. 2009. Biochem. Genet (in Press).
- Gratten et al., 2007. Proceedings of the Royal Society 274:619–626.
- Jackson 1994. Annual Review of Genetics 28:189–217.
- Norris & Whan 2008. Genome Res 18:1282-1293.
- Seo et al. 2007. Veterinary Dermatology 18:392–400.
- Sturm et al. 2001. Gene 277:49-62.

VARIABILITY OF COAT COLOR GENES IN GOATS

ABSTRACT: Pigmentation genes such as *MC1R* (melanocortin receptor 1), *ASIP* (agouti-signaling protein) and *TYRP1* (tyrosinase-related protein 1) play a major role in determining coat color in mammals. With the aim of gaining new insights into the genetic factors that regulate coat color in goats, we have sequenced most of the coding region of the *MC1R*, *ASIP* and *TYRP1* genes in a panel of goat breeds exhibiting different coat colors. Sequence analysis revealed seven polymorphisms in the *MC1R* gene of which five are non-synonymous (Ala81Val Lys226Glu, Val249Phe, Gly255Asp and Cyst267Try) and one is a nonsense substitution. In the *ASIP* gene, we found two non-synonymous mutations (Cys126Gly and Val128Gly). Two silent SNP have been found in the coding region of the *TYRP1* gene. Furthermore, sixteen SNP were detected at intron 2 of *TYRP1*. Currently, we are genotyping these polymorphisms in a panel of goats from different breeds and coat colors.

Keywords: *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1*, pigmentation, caprine

VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA DEL GEN *CORTISOL BINDING GLOBULIN* (CBG)

Esteve, A.¹, Ojeda, A.¹, Folch, J.M.¹ y Pérez-Enciso, M.^{1,2}

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.

² Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, C/ Lluís Companys 23, 08010, Barcelona.

E-mail: anna.esteve@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El gen cortisol binding globulin (CBG), también conocido como serpina 6, es una alfa-globulina de la superfamilia de las serpinas (*serpin peptidase inhibitor*). La proteína se fabrica en el hígado y se libera en la sangre, su principal función es unirse y transportar glucocorticoides como el cortisol. El gen CBG se localiza, en porcino, en el cromosoma 7 próximo al SLA. Estudios previos de Ousova et al. (2004) han mostrado la importancia de este gen en la sensibilidad al estrés en porcino, así como su implicación en la obesidad. Recientemente, Guyonnet-Dupérat et al (2006) identificaron una mutación no sinónima, Arg307Gly, en el exón 4 de dicho gen y que, según los autores, estaría íntimamente asociada con la capacidad de unión de la proteína al cortisol y con la calidad de la carne. El objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad de este gen en un panel de diversas razas porcinas y jabalí, a efectos de determinar si el patrón de diversidad nucleotídica era compatible con un proceso selectivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Se secuenció parcialmente el gen en 21 animales: 3 Duroc (España y USA), 1 Large White (Finlandia), 1 Landrace (España), 1 Tamworth (UK), 1 British Lop (UK), 1 Ibérico Guadyerbas, un animal de raza desconocida de Cabo Verde, 1 Vietnamita, 1 Meishan, 1 Jianxin Black, 1 Jinhua, 1 Huai, éstas últimas razas chinas, así como 4 jabalíes occidentales (Túnez, España e Italia), y uno de China. Como outgroup, se secuenció un Babirusa.

Identificación de polimorfismos

A partir de la secuencia pública del BAC porcino del cromosoma 7 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/) se localizó la posición del gen CBG porcino. Se diseñaron 6 pares de cebadores para amplificar por PCR un total de aproximadamente 6 kb. La región 1 (~1kb) abarca parte de la 5' flanqueante del gen, el exón 1 y parte del intrón 1. La región 2 (~1kb) comprende parte del intrón 2, el exón 3 y parte del intrón 3. La región 3 (~4 kb) incluye parte del intrón 3, el exón 4, el intrón 4, el exón 5 y parte de la región 3' flanqueante del gen. Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados mediante *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* en un secuenciador ABI PRISM 3730 (*Applied Biosystems*). El análisis de las secuencias e identificación de polimorfismos se realizó mediante el programa *SeqScape v2.5* (*Applied Biosystems*).

Análisis estadístico y genético

A partir de las secuencias se reconstruyeron las fases mediante el programa *Phase v2.1.1* (Li and Stephens 2003) usando las opciones por defecto, excepto que el programa corrió 5 veces y la última interacción fue 10 veces más larga, tal y como sugieren los autores. El índice de diversidad nucleotídica (π), Tajima's D test, Fu and Li test y el HKA test fueron estimados con el DnaSP v4.5 (Rozas et al. 2003). Se realizó un árbol filogenético NJ mediante el modelo Kimura de dos parámetros usando Mega4.1 (Kumar et al. 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han detectado un total de 164 polimorfismos: 147 SNP (incluyendo 18 *singletons*) y 17 *indels* en un total de 5919 pb, esto es, un promedio de un polimorfismo cada 36 pb. De éstos, 21 se

localizaron en exones, 135 en intrones, ninguno en la región 5' flanqueante del gen, y 8 en la región 3' flanqueante del gen. Se encontraron 6 cambios de aminoácido no sinónimos (Tabla 1 y Tabla 2). Algunas de las indels encontradas son bastante largas, de hasta 40 nucleótidos y algunas albergan SNP en su secuencia, además muchas se presentaban en heterocigosis, lo que dificulta el análisis.

Algunos estadísticos están en la Tabla 3. La diversidad nucleotídica (π) de la población europea (incluyendo las razas internacionales y de jabalí) fue de 0,14% para el conjunto de la región secuenciada, mientras que para la población asiática fue 0,96%, lo que indica mucha más variabilidad en Asia que en Europa. Comparando las diversidades nucleotídicas de los cerdos domésticos europeos versus los jabalíes europeos encontramos que éstas fueron 0,17% y 0,04%, respectivamente, observando muy poca variabilidad en estos últimos. Se realizó el test HKA comparando la región 1 del gen con las regiones intrónicas y se obtuvo un resultado significativo, indicando que las regiones están sometidas a presiones evolutivas diferentes.

La Figura 1 muestra un árbol filogenético NJ con los haplotipos de la región 3 que contiene la mutación Arg307Gly descrita. Es evidente la divergencia profunda entre orígenes geográficos (Asia vs. Europa), aunque el animal Landrace (LRES0520) presenta un haplotipo de cada origen, mostrando una vez más la introgresión de germoplasma asiático que se produjo en las razas occidentales. Pero en este caso es aún más interesante hacer notar la posición de los haplotipos con la mutación potencialmente causal. En primer lugar, sólo se observan en haplotipos europeos que, además, presentan muy poca variabilidad. En segundo lugar, no lo hemos observado en jabalí y, en cambio, está a una alta frecuencia en las razas europeas, excepto en cerdo Ibérico. La mutación está presente en razas tan dispares como Tamworth o Landrace.

En conclusión, la diversidad nucleotídica de la especie porcina es muy elevada, casi del 1% en regiones intrónicas en promedio, y hasta 1.6% en el intrón 2. La mayor parte de esta diversidad es de origen asiático. En lo que respecta a la mutación descrita por Guyonnet-Dupérat et al. (2006), ésta es de origen europeo muy reciente, posiblemente apareció después de la domesticación. El hecho de que esté a frecuencia tan elevada en las razas europeas podría ser debido a un barrido selectivo pero, sin embargo, no se aprecia una disminución de variabilidad entre los haplotipos con y sin la mutación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ousova et al. 2004. *Mol Endocrinol* 18(7):1687-96
- Guyonnet-Dupérat et al. 2006. *Genetics*.173(4):2143-9
- Rozas et al. 2003. *Bioinformatics* 19, 2496-2497
- Li, N. & M. Stephens. 2003. *Genetics* 165, 2213-33
- Kumar et al. 2004. *Brief Bioinform* 5, 150-63.

Agradecimientos: Agradecemos a los diversos colegas e instituciones que nos suministraron muestras para este estudio. Trabajo financiado por el MICINN a través del proyecto AGL2007-65563-C02-01/GAN y de becas FPI a Anna Esteve y Ana Ojeda.

NUCLEOTIDE VARIABILITY OF THE CORTISOL BINDING GLOBULIN (CBG) GENE

ABSTRACT: We report nucleotide diversity in cortisol binding globulin, an obesity candidate gene in porcine, by partial resequencing of 20 Asian and European pigs and wild boars. We found a high π (0.68% on average), and was much higher in Asia than in western populations. We also report that the non synonymous aminoacid change Arg307Gly, described by Guyonnet-Dupérat et al. as associated with meat quality and cortisol levels, was only detected in European domestic pig breeds.

Keywords: nucleotide variability, domestication, *serpina 6*, pig.

Tabla 3. Variabilidad nucleotídica de los exones, intrones y regiones flanqueantes, número medio de diferencias entre secuencias y resultados de los estadísticos Tajima's D y FuLiD tests.

Dominio	Π (%)	AvNumDif	TajimaD	FuLiD*
5' flanqueante (428 bp)	0	0	n.d.	n.d.
3' flanqueante (742 bp)	0.18	1.34	-0.82	0.63
exón 1	0	0	n.d.	n.d.
exón 3	0.75	2.04	-0.10	0.11
exón 4	0.32	0.47	1.41	0.56
exón 5	0.44	1.95	-0.75	0.90
regiones exónicas (933 bp)	0.48	4.45	-0.33	0.68
parte intrón 1	0.13	0.61	-1.22	0.19
parte intrón 2	1.61	9.19	0.90	0.84
parte intrón 3	0.84	10.51	-0.10	0.70
parte intrón 4	0.97	13.61	0.33	1.47
regiones intrónicas (3816 bp)	0.91	33.92	0.25	1.11
Total (5919 bp)	0.68	39.72	0.11	1.08

Tabla 1 y Tabla 2. Cambios aminoacídicos no sinónimos encontrados, y muestras que los presentan.

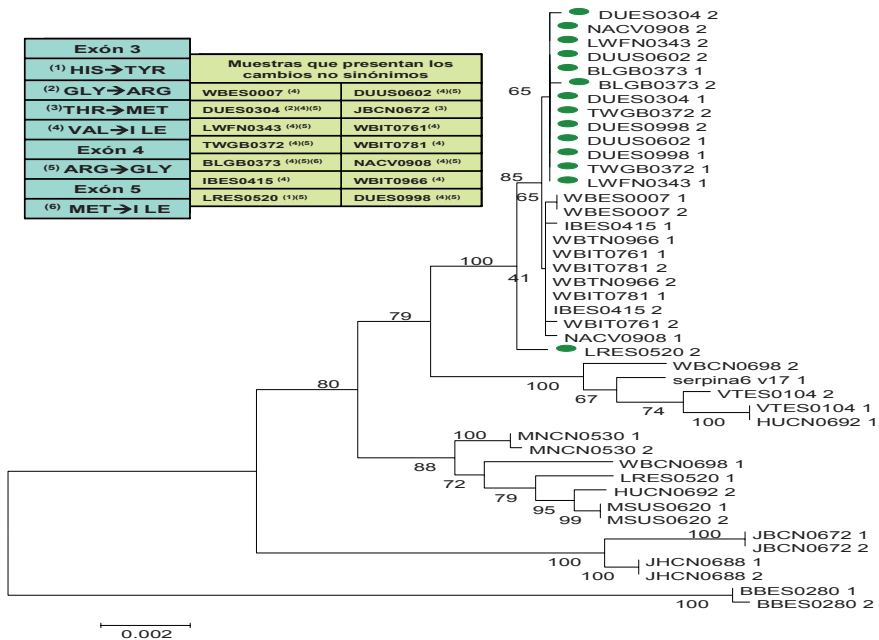


Figura 1. Árbol filogenético NJ (Mega 4.1) elaborado con los haplotipos de la región 3 del gen *cbg*. Se ha marcado con un círculo aquellos haplotipos que presentan el cambio de aminoácido no sinónimo descrito por Guyonnet-Dupérat et al (2006).

Patología Animal

PREVALENCIA E INTENSIDAD DE PARASITACIÓN EN GRANJAS DE PEQUEÑOS RUMIANTES EN GALICIA

Cienfuegos, S., Díaz, P., Vázquez, L., Dacal, V., Lago, N., Pato, J., Fernández, G., Panadero, R., Viña, M., Morrondo, P., Díez, P. y López, C¹.

Sanidad Animal. Dpto de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo (Spain). eMail: c.lopez@usc.es

INTRODUCCIÓN

En Galicia el ganado ovino y caprino se explota de manera extensiva o semiextensiva, lo que aumenta la probabilidad de adquirir determinadas parasitaciones, que pueden suponer una merma en la producción y, por tanto, en el rendimiento económico de las explotaciones (Respaldiza et al., 1987). Las técnicas coprológicas, a pesar de tener menor sensibilidad que las técnicas serológicas (Paz et al., 2003), presentan una especificidad más alta y la toma de muestras resulta menos agresiva para los animales y más fácil de realizar, por lo que constituyen el método de elección para conocer el nivel de parasitación de un rebaño. Una alternativa al análisis individualizado de cada muestra fecal, con el fin de reducir su laboriosidad, coste en tiempo, dinero y mano de obra técnica especializada, puede ser la utilización (Pradenas et al., 2008) de mezclas de muestras recogidas individualmente en cada explotación ("pools"), como se han utilizado para detectar algunas enfermedades infecciosas (Collins, 1996; Kalis et al., 2000). El muestreo por "pools" puede presentar una mayor eficacia para detectar infecciones frente a análisis individuales cuando la prevalencia individual es baja (Christensen y Gardner, 2000). Por ello, para conocer las parasitaciones más frecuentes en los pequeños rumiantes de Galicia se han estudiado un número elevado de rebaños de ovino, caprino y mixtos, mediante análisis coprológicos de "pools". Esta técnica es utilizada de forma rutinaria por los veterinarios clínicos para llevar a cabo un control a través de tratamientos estratégicos en función de las poblaciones parasitarias encontradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primavera y otoño de 2007 y 2008 se recogieron muestras fecales en 251 explotaciones (662 "pools") de Galicia. Las heces se tomaron directamente del recto de los animales con guantes de plástico y se conservaron a 4°C hasta su procesado. Las muestras se tomaron de un 10% de cada rebaño, y en ningún caso menos de 5 animales. Una vez en el laboratorio se realizaron "pools" de cada explotación mezclando las heces de 5-10 animales hasta alcanzar el peso determinado para cada técnica coprológica. Mediante la flotación (3g) se comprobó si el conjunto de los animales eliminaban huevos de nematodos gastrointestinales y cestodos (h.p.g.) u ooquistes de coccidios (o.p.g.); con la técnica de sedimentación (4g) se trató de detectar la eliminación de huevos de trematodos (h.p.g.) y, finalmente, mediante la técnica de migración (10g) la eliminación de larvas 1 de *Dictyocaulus filaria* o de protostrongílidos (l.p.g.). En el análisis de los resultados se tuvieron en cuenta los siguientes factores: área climática (Centro, Costa y Montaña) para ver el efecto de las condiciones ambientales sobre las infecciones parasitarias; tipo de rebaño, (ovino, caprino o mixto), para detectar la interacción en las parasitaciones entre los pequeños rumiantes. También se introdujeron el año y la estación como factores de estudio.

Para detectar las variaciones en prevalencia de las diferentes parasitaciones entre las diferentes áreas climáticas, tipo de rebaño, año y estación aplicamos el algoritmo Chaid exhaustivo (Luque Martínez, 2000) utilizando el módulo AnswerTree 3.1 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU., 2005). Para analizar las variaciones en la intensidad de eliminación de las diferentes formas parasitarias en función de los mismos factores se utilizó un ANOVA multifactorial y la

prueba de Tukey como análisis post-hoc con el paquete estadístico SPSS v.17.0.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia e intensidad de eliminación de las diferentes formas parasitarias se muestran en la Tabla 1. El parásito más frecuente en las muestras obtenidas de los rebaños es *Eimeria* spp (92,4%), seguido por los nematodos gastrointestinales (90,4%), broncopulmonares (protostrongílidos 46,7% y *D. filaria* 19,8%), cestodos (*Moniezia* spp. 12,7%) y finalmente los trematodos (*Fasciola* spp 9,4%, anfishomidos 1,1% y *Dicrocoelium* spp. 0,6%). Estas cifras son muy diferentes a las observadas por Respaldiza et al. (1987) en el centro de España; en este estudio la parasitación más frecuente era la infección por nematodos gastrointestinales (39,8%) y la coccidiosis no alcanzaba el 5%, aunque en este caso la prevalencia estudiada era individual, no por explotaciones. En otra investigación realizado en la provincia de Zaragoza (Sánchez Acedo et al., 1979) el parásito más frecuente fue *Fasciola hepatica* (77%), seguida por los nematodos gastrointestinales (50%) y *Dicrocoelium* spp. (43%), parásito este último muy escaso en nuestro estudio, debido seguramente a las diferentes condiciones climáticas y orográficas entre ambas regiones que posiblemente dificultan el desarrollo de los hospedadores intermediarios.

Tabla 1. Prevalencia e intensidad de eliminación de las diferentes formas parasitarias en rebaños de pequeños rumiantes de Galicia (media±desviación estándar)

	2007		2008		TOTAL
	Primavera	Otoño	Primavera	Otoño	
<i>Eimeria</i> spp	84,9% 744,8±1761,2	95,5% 4783,6±26199,4	91,60% 1150,2±2219,3	96,6% 5300,3±48454,7	92,40% 3077,1±29963,5
G.I.*	85,6% 499,0±608,7	90,2% 1062,6±1315,8	92,1% 522,6±601,5	93,8% 596,0±763,6	90,4% 632,4±836,8
<i>Nematodirus</i> spp	15,8% 57,9±79,6	14,3% 42,2±43,5	12,4% 72,6±68,0	12,90% 35,2±12,5	13,6% 52,4±57,8
Protostrongílidos	51,8% 59,4±176,3	46,4% 73,6±121,9	48,5% 88,0±312,9	44,9% 68,8±133,6	46,7% 73,4±210,7
<i>D. filaria</i>	16,5% 12,5±16,3	25,0% 1,0±1,4	19,80% 2,5±7,0	19,2% 1,2±1,7	19,8% 1,8±4,9
<i>Moniezia</i> spp	5,0% 135,7±146,4	19,6% 100,0±143,5	13,4% 171,3±204,6	13,4% 108,9±109,3	12,7% 128,9±157,2
<i>Fasciola</i> spp	13,7% 147,4±141,0	5,4% 107,3±83,8	11,4% 119,9±130,3	6,7% 61,7±68,1	9,4% 114,0±120,6
Anfishomidos	0,7% 166±-	-	1,0% 103,5±87,0	1,9% 230,5±238,3	1,1% 185,0±182,5
<i>Dicrocoelium</i> spp	0,7% 50±-	-	0,5% 42,0±-	1,0% 65,0±63,6	0,6% 55,5±38,5

* G.I. (Nematodos gastrointestinales)

Al estudiar el efecto de los diferentes factores (área climática, tipo de rebaño, año y estación) de las diferentes parasitaciones se observaron diferencias significativas en la prevalencia de los nematodos gastrointestinales debidas al año (F= 5,327, P< 0,05) siendo más elevada en el año 2008 (92,9%) que en 2007 (87,6%).

En el caso de los nematodos broncopulmonares, la prevalencia a nivel de explotación se ve influida por la presencia de cabras en los rebaños. Así, en los rebaños puros de ovino la prevalencia por protostrongílidos es mucho menor (30,5%) que en los rebaños de cabras o

mixtos (86,8%; F= 238,675, P< 0,001). Por el contrario, en la infección por *D. filaria*, los rebaños de cabras presentan una prevalencia menor (4,9%) que los de ovino o mixtos (23,2%; F= 21,594, P< 0,001).

Respecto a la intensidad de eliminación de las diferentes formas parasitarias, solo se observaron diferencias en la eliminación de huevos de nematodos G.I. en relación con las áreas climáticas. Así, en la primavera de 2007 los animales de las explotaciones de la zona de la Montaña eliminaban un número significativamente menor (F= 6,326; P< 0,01) de h.p.g. que los de la zona Centro (P< 0,01) y Costa (P< 0,01) (Figura 1). En otoño de 2008 de nuevo se detectaron diferencias en la eliminación de huevos de nematodos G.I. (F= 4,969, P< 0,01), siendo de nuevo más baja la eliminación media de las explotaciones de la Montaña frente a las del Centro (P< 0,01).

En Galicia, los parásitos más frecuentes en los pequeños rumiantes son de ciclo directo, seguramente por que su ciclo vital se ve favorecido por la temperatura moderada y la elevada humedad que están presentes a lo largo del año en la mayor parte del territorio gallego. También podemos destacar la prevalencia de los nematodos pulmonares, en concreto los protostrongilidos, debido a que la supervivencia de su hospedador intermediario, moluscos terrestres, se ve favorecida también por estas mismas condiciones. Podemos destacar también la baja prevalencia de *Fasciola* spp. en relación a otras regiones (Sánchez Acedo et al., 1979), situación que puede ser explicada por el hábitat de los animales, en general zonas montañosas y terrenos inclinados, lo que puede suponer una mayor dificultad para formarse zonas encharcadas y húmedas favorables para *Lymnaea*, su hospedador intermediario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Collins, M.T. 1996. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12:357-371.
- Christensen, J., Gardner, I.A. 2000. *Prev Vet Med* 45: 83-106.
- Kalis, C.H.J., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., Collins, M.T. 2000. *J Vet Diagn Invest* 12:547-551.
- Luque Martínez, T. 2000. Ediciones Pirámide; 347-382.
- Paz, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., López, C., Panadero, R., Díaz, P. Díez, P., Morrondo, P. 2003. *Parasitol Res.* 91:328-31
- Pradenas, M., Kruzea, J., van Schaik, G. 2008. *Arch Med Vet* 40, 31-37.
- Respaldiza, E., Fuentes, O., Simón, M.C., Benito, C. 1987. *XII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, 33-39.
- Sánchez Acedo, C., Castillo, J.A., Gutiérrez, J.F. 1979. *IV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia*, 549-561.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PGIDIT06RAG26101PR (Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia, España)

HERD PREVALENCE AND INFECTION INTENSITY IN SMALL RUMINANTS IN GALICIA.

ABSTRACT: 251 herds have been studied in 2007 and 2008 to know the most frequent parasite infection in sheep and goats in Galicia. Pools of 5-10 fecal samples were used with coprological techniques to detect infections in farms. *Eimeria* spp (92,4%) and gastrointestinal nematodes (90,4%), are the most common parasites and, in a lesser extent, bronchopulmonary nematodes (protostrongylids 46,7% and *Dictyocaulus filaria* 19,8%), cestodes (*Moniezia* spp 12,7%) and trematodes (*Fasciola* spp 9,4%, amphistomes 1,1% and *Dicrocoelium* spp 0,6%). Gastrointestinal nematode prevalence was influenced by the year and in the case of bronchopulmonary larvae by the type of herd; in pure ovine herds, the prevalence of protostrongylids was lower than in goat or mixed flocks; on the other hand, *D. filaria* infection was higher in ovine flocks than in goat or mixed herds. Finally, trematode prevalences were low.

Keywords: parasites, Galicia, herd, small ruminant

EFFECTO DE LA ESPARCETA, ZULLA Y ARTEMISIA EN EL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN DE CORDEROS CON *Haemonchus contortus*

Valderrábano, J., Gómez-Rincón, C., Calvete, C. y Uriarte, J.

CITA de Aragón. Avda de Montañana 930. 50059-Zaragoza. jvalderrabano@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La infección por nematodos gastrointestinales (GI) es, probablemente, el mayor factor limitante para la producción animal en pastoreo. El preocupante aumento de la prevalencia de nematodos resistentes a los antihelmínticos en diversas partes del mundo ha estimulado la búsqueda de soluciones alternativas tales como el uso de plantas con propiedades antiparasitarias.

Aunque los compuestos del metabolismo secundario (PSM) de las plantas parecen actuar sobre la biología del parásito, las respuestas sobre la infección presentan una gran variabilidad (Hoste, 2006) debido a que sus efectos pueden manifestarse en diversas fases del ciclo del parásito, bien directamente sobre su desarrollo, modificando el medio donde se desarrollan o indirectamente estimulando la respuesta inmune del huésped.

La mayoría de los trabajos referenciados contemplan los efectos de forrajes con un elevado contenido en taninos condensados (CT), y la respuesta más frecuentemente observada se refiere a una caída en la excreción de huevos, lo que se valora en términos de una menor contaminación de los pastos. Sin embargo, falta información que integre la respuesta del consumo de plantas bio-activas sobre las fases endógenas del parásito y su efecto sobre desarrollo larvario en las heces, para poder valorar sus consecuencias epidemiológicas. Por otra parte, los estudios sobre la persistencia de la actividad antihelmíntica en forrajes bio-activos desecados son escasos, a pesar de la flexibilidad y ventajas potenciales que ofrece esta forma de presentación para su uso en explotaciones ovinas.

En este ensayo se pretende explorar el potencial bioactivo de forrajes desecados de zulla, esparceta y artemisia frente a *Haemonchus contortus* y su posible modo de acción en diferentes estadios de desarrollo del parásito respecto a la alfalfa.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó con 12 machos y 12 hembras Rasa Aragonesa de 4 meses de edad con un peso inicial de $22.6 \pm \text{s.e. } 0.412$ kg PV que fueron desparasitados (Panacur® Hoest) y alojados en cajas individuales con suelo de rejilla hasta el final del ensayo. Los corderos se pesaron e infectaron con 7000 L₃ de *H. contortus* en una dosis única, distribuyéndose en 4 grupos de 6 animales equilibrados por sexo y peso vivo que fueron alimentados con heno de zulla (*Hedysarum coronarium*; Z), heno de esparceta (*Onobrychis viciifolia*; E) y artemisia (*Artemisia absinthium*; A) incluida al 20% en pellets de alfalfa molidos. El cuarto grupo fue alimentado con heno de alfalfa (*Medicago sativa*; L) como dieta control. Todas las dietas fueron ofrecidas *ad libitum* y los corderos tuvieron acceso permanente a bloques minerales y agua.

Semanalmente se tomaron muestras de sangre y se pesaron las cantidades de material ofrecido y rehusado de cada dieta para estimar la ingestión por diferencia. Los crecimientos de los corderos se calcularon a partir de las regresiones establecidas entre PV y tiempo.

A los 30 días de la infección se sacrificaron todos los animales determinándose la carga parasitaria del abomaso (Valderrábano et al., 2002). El contenido del intestino grueso fue recogido y homogeneizado, y tras valorar en una alícuota el número de huevos en las heces por el método de McMaster, una 2ª muestra fue desecada con objeto de expresar los resultados en huevos por g de materia seca fecal (hpg). La fecundidad de las hembras se calculó a partir del hpg y el número de hembras adultas recogidas.

Las tasas de eclosión de huevos y desarrollo larvario se determinaron a partir de coprocultivos individuales mantenidos a 25 °C, 90% de humedad durante 7 días.

El análisis de la varianza se realizó previa transformación $\log(n+1)$ ó arco seno para normalizar la distribución de los datos, sin embargo los datos se presentan en las unidades originales para facilitar su interpretación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las dietas ofrecidas fueron similares para la mayoría de las características determinadas, con la excepción de la concentración en CT que resultó notablemente menor en alfalfa y artemisia (0.3 vs. 0.34% respectivamente) que en zulla y esparceta (3.03 vs 2.65%). Aunque los machos presentaron mayores pesos que las hembras al inicio del ensayo (24.2 vs 21.1 kg PV), no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros analizados debidas al sexo. La ingestión de MS de las distintas dietas a que fueron sometidos los corderos no difirió significativamente de la de los animales alimentados con alfalfa (34.1 g MS/kg PV), pero sus crecimientos resultaron inferiores ($P < 0.05$) a los de los demás tratamientos, aunque solo fueron significativos para Artemisia y Esparceta. Estas diferencias en crecimiento podrían ser debidas a un efecto de PSM sobre eficacia nutritiva o/y a la reducción en la carga de vermes dado que todos los tratamientos nutritivos presentaron menor carga parasitaria que la alfalfa (4039.5 \pm 337.39 vermes) con disminuciones del 8 (Z), 13 (E) y 49% (A), si bien solo las diferencias frente a artemisia fueron significativas ($P < 0.05$). No se observaron diferencias en la relación hembras/machos (1.159) entre tratamientos.

La excreción de huevos en las heces se vio, asimismo, reducida en un 22 (Z), 54 (E) y 73% (A) respecto a la alfalfa (27043 \pm 10160,8 hpg) aunque únicamente resultaron significativas ($P < 0.05$) para artemisia y esparceta (Fig 1).

La reducción en hpg observada no pareció asociada a la cantidad de CT en la dieta lo que sugiere que pueda ser debida a otros compuestos específicos con una actividad diferenciada sobre la implantación y desarrollo de las L_3 ó indirecto sobre la respuesta inmune. La menor carga parasitaria en el caso de la artemisia parece indicar un mayor efecto sobre la implantación larvaria, probablemente debido a su contenido en sexquiterpeno lactonas que fue relacionado con la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa y en consecuencia con la motilidad y viabilidad de nematodos parásitos tanto de plantas (Korayem et al., 1993), como de parásitos pulmonares y gastrointestinales del ganado ovino (Molan et al., 2003).

Por otra parte, la reducción en la fecundidad de las hembras de *H. contortus* ($P < 0.05$) en Esparceta sugiere un efecto en la respuesta inmune asociado a la dieta aunque no se encontraron diferencias en la concentración de eosinófilos entre tratamientos. La falta de respuestas significativas en el caso de la zulla, que presentó un contenido en CT similar a la esparceta, parece enmarcarse dentro de la variabilidad de resultados obtenidos *in vivo* y atribuidos a la presencia de otros compuestos activos adicionales que interactúen con los CT (Hoste, 2006).

Aunque diversos componentes nutritivos de la dieta, en particular la energía y la proteína, podrían afectar la adquisición y expresión de la respuesta inmune, la composición de las dietas utilizadas en términos de energía y proteína fueron relativamente similares por lo que no parece que las diferencias en la respuesta a estos alimentos pueda ser atribuida a un efecto nutricional directo de estos componentes. Sin embargo, la relación inversa observada entre fertilidad de las hembras de *H. contortus* y el crecimiento de los corderos ($r^2 = 0.858$) en el conjunto de los tratamientos sugiere una mejora en la respuesta inmune asociada a la dieta y derivada, probablemente, de la capacidad de unión de los CT con la proteína de la dieta mejorando su capacidad de utilización digestiva, lo que concuerda con resultados previos en corderos infectados con *Teladorsagia circumcincta* y mantenidos en distintos planos de alimentación con pellets de alfalfa (Valderrábano et al., 2002).

Independientemente del modo de acción de los compuestos bio-activos de las plantas sobre las fases endógenas de los parásitos, el análisis coprológico de las heces procedentes de los distintos tratamientos mostró una reducción significativa ($P < 0.01$) en la tasa de eclosión de las dietas de Z (46.11) y E (63%) respecto a las de L (90.5%) y A (84.4%) que no

difierieron entre si pero, sorprendentemente, la tasa de evolución a L₃ se incrementó tanto en Z (22% ;P<0.01) como en E (9.86%) respecto a la L (6.84%) y A (6.8%).

Al integrar los niveles de excreción de huevos en las heces con los de evolución a L₃ en las heces, el riesgo potencial de infección del pasto en las dietas de zulla se incrementaría 2,5 veces respecto a las de alfalfa mientras que las de esparceta y artemisia se verían reducidas en un 34 y 73% respectivamente (Figura 2).

Los resultados obtenidos sugieren que los factores de la dieta pueden modificar notablemente el desarrollo larvario en las heces alterando las tendencias de riesgo de infección del pasto estimado a partir de la excreción fecal.

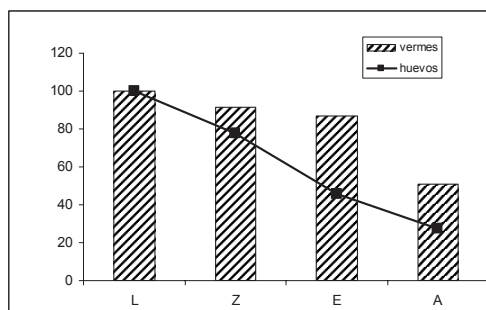


Figura 1. Evolución relativa de la carga de vermes y excreción de huevos respecto a la alfalfa

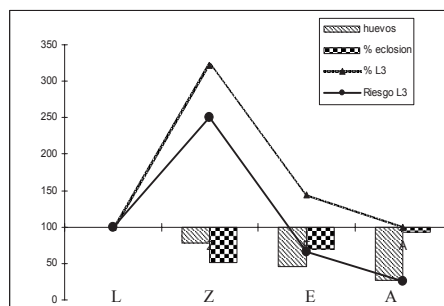


Figura 2. Evolución relativa del riesgo de infección de L₃ respecto a la alfalfa

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S., Hoskin, S.O. 2006. *Trends Parasitol.* 22: 253-261.
- Valderrábano, J., Delfa, R., Uriarte, J. 2002. *Vet. Parasitol.* 104: 327-338.
- Korayem, A.M., Hasabo, S.A., Ameen, H.H. 1993. *Anz. Schädlingsske* 66: 32-36.
- Molan, A.L., Duncan, A.J., Barry, T.N., McNabb, W.C. 2003. *Parasitol. Int.* 52: 209-218.

SAINFOIN, SULA AND WORMWOOD EFFECTS ON *Haemonchus contortus* INFECTION IN LAMBS

ABSTRACT: The effect of sula, sainfoin, wormwood and lucerne dried forages consumption on pathophysiology and larval development in faeces of growing lambs infected with *Haemonchus contortus* was explored. Twenty-four lambs, 4 months old, were allocated to 1 of 4 treatment groups (n=6) that were offered either sula (Z; CT=3.03%), sainfoin (E; CT=2.65%), wormwood (A; CT=0.34%) and Lucerne (L; CT=0.3%) dried forages and infected with 7000 L3 *H. contortus* larvae in one dose. Voluntary intake was similar for all treatments but liveweight gains were affected (P< 0.05) by diet showing L lambs the lowest growth rate. Total worm and faecal egg counts for Z, E and A were 8, 13 and 49% and 22, 54 and 73 % respectively lower than for L lambs 30 days after infection. No effect was found of CT content of diets on faecal egg count but worm fecundity appeared inversely related with lambs growth rate ($r^2= 0.858$). Egg hatching in faecal cultures of Z (46%) and E (63%) were significantly lower (P< 0.01) than of L (90.5%) lambs, while larval development test showed an increase in L₃ recovered from faeces of lambs fed on Z (22%) and E (9.86%) respect of those from L (6.84 %) and A (6.8%) diets. Results obtained suggest that dietary factors could notably affect larval development in faeces altering the tendencies of risk of infection derived from faecal egg excretion.

Keywords: sula, sainfoin, wormwood, lucerne, *H. contortus*, lambs

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL NITROXINIL EN INFECCIONES NATURALES DE *Fasciola hepatica* EN UNA EXPLOTACIÓN DE OVINO RESISTENTE AL TRICLABENDAZOL

Martínez-Valladares M., Famularo M.R., Fernández-Pato N., Castañón-Ordóñez L. y Rojo-Vázquez F.A.

Facultad de Veterinaria de León, Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Sanidad Animal, 24071. León. mmarva@unileon.es

INTRODUCCIÓN

En España la fasciolosis está ampliamente distribuida. Según análisis coprológicos, el 30% de los rebaños ovinos de la zona noroeste del país están infectados; sin embargo, estos valores ascienden hasta el 56% cuando se realiza el diagnóstico inmunológico (Ferre et al., 1995) e incluso alcanzan índices mayores en otras zonas del país (García-Pérez y Juste-Jordán, 1987). El control se apoya en la administración de fasciolicidas, algunos muy eficaces sobre todo frente a los vermes adultos. Sin embargo, la incorrecta utilización de antihelmínticos, el manejo, y otros factores, favorecen el desarrollo de resistencias en las poblaciones parasitarias. En algunos grupos de helmintos y especies animales, el problema ha llegado a ser preocupante. En *Fasciola hepatica*, ya se han observado resistencias a diferentes fasciolicidas. La primera descripción de resistencia en *F. hepatica* se registró frente al hexaclorofeno (Dorsman, 1968). Más recientemente, Boray (1990) describió resistencia colateral de *F. hepatica* a rafoxanida y closantel. Frente al triclabendazol, Overend y Bowen (1995) describieron resistencias en Australia. Desde entonces, hay nuevos registros en toda Europa. En España, en 2006 se describió la primera resistencia doble al albendazol y triclabendazol (Álvarez-Sánchez et al., 2006) en ovinos de la provincia de León. En el presente trabajo vamos a comprobar la eficacia del nitroxinil en un rebaño que se ha descrito la resistencia al triclabendazol.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en un rebaño ovino con antecedentes de resistencia al triclabendazol. Previamente al estudio se comprobó la eliminación de huevos por gramo de heces (hgh) de *F. hepatica* en todos los animales del rebaño. A partir de estos datos, se seleccionaron los 45 animales que eliminaban más hgh y se dividieron en tres grupos: G1 - tratados con nitroxinil; G2 - tratados con triclabendazol; y G3 - grupo testigo. El día 0 del estudio, se identificaron 15 animales por cada grupo mediante un collar de diferente color según el tratamiento. Cada oveja se pesó, se determinó su estado físico y condición corporal, y, a cada uno de los animales de los dos grupos tratados, se les administró el antihelmíntico correspondiente, nitroxinil y triclabendazol, a la dosis recomendada por el fabricante. A los animales del grupo testigo se les administró agua por vía oral.

Se tomaron muestras de heces y de sangre los días 0, 17, 24, 31, 38, 44, 51 y 59 post-tratamiento a todos los animales del estudio. Los análisis fecales se realizaron siguiendo la técnica de sedimentación simple. También se determinó el nivel de IgG mediante ELISA indirecto frente antígeno de excreción-secreción de *F. hepatica* según describe Vara del Río (2007).

Con los datos de cada animal, se calculó la media de eliminación de huevos con las heces por día y grupo. Tras ello, se determinó la reducción fecal de huevos (FERCT); es decir, el porcentaje de reducción de huevos con las heces de cada día del ensayo en relación al grupo testigo. La comparación estadística entre los grupos tratados y testigos deberá ser significativa estadísticamente a un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Excreción de huevos con las heces.

Se calculó la eliminación media de hgh por grupo y día y se comprobó la presencia de diferencias significativas en las eliminaciones entre los animales tratados y testigos. Entre el grupo tratado con triclabendazol y el testigo se observaron los días 24, 38 y 51 pt ($P < 0,01$).

Respecto al grupo del nitroxinil y el testigo, también se describieron los días 17, 24, 31, 38 y 51 pt ($P < 0,01$).

Tabla 1. Eliminación de huevos con las heces (hpg) durante el ensayo

Día post-tratamiento	0	17	24	31	38	44	51	59
TRICLABENDAZOL	100,2	26,2	25,4	20,4	30	26,9	17,1	18,1
NITROXINIL	102,4	12,4	15,1	10,8	41,2	34,7	15,6	21,1
CONTROL	121,2	55,9	70,9	45,6	116,5	50,8	81,8	86,1

Tras ello, se calculó el porcentaje de reducción de huevos con las heces por día en función al grupo control. Los resultados se exponen en la siguiente tabla 2.

Tabla 2. FERCT (%) de cada día de muestro con respecto al grupo control

Día post-tratamiento	17	24	31	38	44	51	59
TRICLABENDAZOL	53,1	64,2	55,3	74,2	47	79,1	79
NITROXINIL	77,8	78,7	76,3	64,6	31,7	80,9	75,5

Mediante FECRT, se considera que un fármaco es eficaz cuando la reducción es $\geq 90\%$. La del nitroxinil, administrado por vía subcutánea, es del 91-99% frente a fasciolas adultas (más de diez semanas de edad); y del 50-90% frente a las formas de 7 a 9 semanas de edad (Fairweather y Boray, 1999). Los resultados de este estudio demuestran que la eficacia del triclabendazol cuya actividad es superior al 90% frente a fasciolas muy jóvenes (una semana) y casi absoluta (99-100%) frente a vermes de tres semanas o más (Fairweather y Boray, 1999), fue del 47–79% lo que significa un fallo terapéutico asociado a resistencia antihelmíntica. En cuanto al nitroxinil, los datos reflejan que este antihelmíntico tiene mayor eficacia que el triclabendazol, aunque tampoco alcanza el 90%. La eficacia del nitroxinil antes de los 38 días post-tratamiento (días 17, 24 y 31 pt) fue del 76 al 79% lo que, tratándose de infecciones naturales, demostró la existencia de poblaciones adultas, mayoritarias, y de juveniles en menor proporción de *F. hepatica*. De la misma manera, a partir del día 31 pt y hasta el final de la experiencia, los porcentajes de actividad fueron algo menores (31-81%).

Durante el muestreo, por lo tanto, la población parásita estaría constituida por fasciolas inmaduras, que no fueron eliminadas por el antihelmíntico unas semanas atrás; y por los adultos procedentes de la infección del otoño (durante el estudio clínico) que alcanzaron la madurez en la última fase del ensayo.

2. Determinación de IgGs totales

Se analizaron los títulos de IgG total frente antígeno de excreción-secreción de *F. hepatica*.

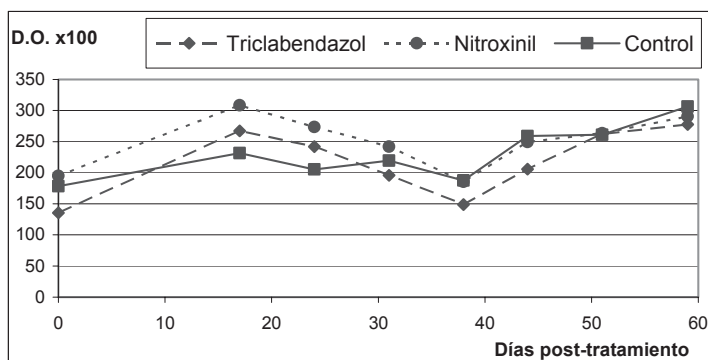


Figura 1. IgGs totales frente al antígeno de excreción-secreción de *F. hepatica*.

Los niveles de anticuerpos aumentaron el día 17 pt en los tres grupos para posteriormente alcanzar los valores más bajos el día 38 pt, y tras ello volvieron a aumentar. El máximo del día 17 pt en el título de anticuerpos se relacionó significativamente ($P < 0,05$) con la menor eliminación de huevos con las heces; y el nivel más bajo – el día 38 pt – con un incremento de la excreción de huevos fecales.

A lo largo del ensayo se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados y los testigos. Entre el grupo tratado con el triclabendazol y testigo se describieron para los días 38 ($P < 0,05$) y 44 ($P < 0,01$) pt; y entre los tratados con nitroxinil y el testigo, los días 17 y 24 ($P < 0,01$) pt.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alvarez-Sánchez, M.A., Mainar-Jaime, R.C., Pérez-García, J., Rojo-Vázquez, F. A. 2006. *Vet Rec.* 159: 424-5. • Boray, J.C. 1990. In: Boray J.C., Martín, P.J. y Roush, R.T. (eds). *Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs*. New Jersey, p 51-60. • Dorsman, W. 1968. *Wiad Parazytol.* 14: 631-8. • Fairweather, I., Boray, J.C. 1999. *Vet. J.* 158: 81-112. • Ferre, I., Ortega-Mora, L. M., Rojo-Vázquez, F.A. 1995. *Parasitol. Res.* 81: 137-42. • García-Perez, A. L., Juste-Jordan, R. A. 1987. *Rev. Iber. Parasitol.*, vol. Extraordinario, 105-13. • Overend, D. J., Bowen, F. L. 1995. *Austr. Vet. J.* 72: 275-6. • Vara del Río, M. P. 2007. Tesis de Doctorado de la Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

Agradecimientos: El presente estudio ha sido cofinanciado por Laboratorios Ovejero, S.A., León (España) y por INIA-MEC, RTA2006-00183-C03-02.

EVALUATION OF THE EFFICACY OF NITROXYNIL IN NATURAL INFECTIONS OF *Fasciola hepatica* IN A FARM WITH RESISTANT SHEEP AGAINST TRICLABENDAZOLE

ABSTRACT: In Spain the infection by *F. hepatica* is widely distributed. According to coprological analysis, around the 30% of flocks in the northwest part of the country are infected, reaching higher levels (56%), when the immunological diagnosis is carried out. The control is based on the use of fasciolicides, some of them very efficient against adult forms. However, the wrong use of them, the management and other factors favours the development of resistance flukes.

The aim of the present study was to evaluate the efficacy of the drug nitroxinil in a farm previously identified as resistant to triclabendazole. After measuring the eggs per gram (epg) in faeces along the assay we observed significant differences between the treated groups and the control group. The FECRT (faecal egg count reduction test) was carried out per day in each treated group, compared to the control group. The results showed an efficacy between 47-79% in the triclabendazol group. These values confirmed the presence of resistance to this drug since under normal conditions has an efficacy of 90% against immature flukes and of 99-100% against adult worms. However, the efficacy of nitroxinil is lower than triclabendazole; between 50-90% against forms with 7-9 weeks old and between 91-99% in adult forms. In this case, we observed an efficacy during the first month of the assay around 76-79% for the nitroxinil. We also measured the level of IgG against excretion-secretion antigen of *F. hepatica*. Significant differences were described between treated groups and the control group. Moreover, a negative significant correlation was found with the epg the day 17 pt, the lower is the level of epg, the higher is the level of IgG. We conclude that the efficacy of the nitroxinil in this farm is better than the efficacy of the triclabendazole, even without getting the 90% of efficacy.

Keywords: *Fasciola hepatica*; antihelminthic resistance; nitroxinil; triclabendazole; IgG.

EFFECTO DEL NIVEL DE NUTRICION SOBRE LA RESISTENCIA DE *Haemonchus contortus* FRENTE A BENCIMIDAZOLES EN OVEJAS

Calvete, C.¹, Calavia, R.¹, Ferrer, L.M.², Ramos, J.J.², Lacasta, D.², Ruíz-de-Arkaute, M.², Valderrábano, J.¹ y Uriarte, J.¹

¹CITA de Aragón. Avda de Montañana 930. 50059-Zaragoza. ²Dpto Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Zaragoza. ccalvete@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La lucha contra las parasitosis en la ganadería de rumiantes se ha basado principalmente en la administración de sustancias antihelmínticas pertenecientes, sobre todo, a las familias de los bencimidazoles o de las lactonas macrocíclicas. El uso reiterado de estos antihelmínticos ha derivado en un incremento de la resistencia genética de las poblaciones parasitarias (Jabbar et al., 2006).

Una de las principales herramientas para prevenir el aumento de la resistencia es el desarrollo de programas dirigidos a monitorizar su evolución a lo largo del tiempo, mediante la estimación de la tasa de reducción en la eliminación de huevos (FECRT) o del efecto del antihelmíntico sobre la eclosión de los huevos o el desarrollo larvario de los parásitos.

No obstante, no toda la resistencia observada o medida con estas técnicas parece ser debida únicamente al desarrollo de resistencia genética frente a estas sustancias por parte del parásito, ya que en ocasiones se observan variaciones en los niveles de resistencia sin una explicación aparente. La identificación de estos factores que pueden influir en la magnitud de la resistencia medida con las técnicas anteriores resulta primordial para poder interpretar los resultados de cualquier estudio y poner en su justo valor la prevalencia o la intensidad de resistencia medida por estas técnicas.

En consecuencia, y teniendo en cuenta que trabajos anteriores han puesto de manifiesto la estrecha relación entre el estado nutricional del hospedador y la viabilidad y la fenología del nematodo *Haemonchus contortus* (Valderrábano et al., 2002), en el presente trabajo se ha tratado de comprobar si la resistencia observada de éste parásito frente a antihelmínticos de la familia de los bencimidazoles puede variar significativamente en función del estado nutricional del hospedador.

MATERIAL Y METODOS

El ensayo se realizó con 30 ovejas Rasa Aragonesa libres de parásitos, alojadas en jaulas individuales con suelo de rejilla, que habían sido previamente tratadas con esponjas vaginales para sincronizar el celo. Cinco semanas después de la cubrición los animales fueron distribuidos en dos lotes de 15 animales, y a partir de ese momento, uno de los lotes fue alimentado *ad libitum* con pellets de alfalfa mientras que el otro (lote racionado) recibió una ración equivalente a 0,7 sus necesidades de mantenimiento. El día 90 de gestación todas las ovejas fueron infectadas con 5000 larvas infectantes de *H. contortus*, y a partir de ese día todos los animales recibieron 30 g de alfalfa por kg de peso vivo al día en base a su PV a las seis semanas post cubrición. Finalmente, todas las ovejas fueron desparasitadas con albendazol a razón de 5mg/kg (Valbazén® Pfizer) el día 56 posterior a la infección.

El estado nutricional se valoró mediante la estimación del espesor (E) en mm de la grasa en el cuadrado lumbar mediante ultrasonidos los días 0 y 56 post infección. La cantidad de huevos de *H. contortus* excretados por gramo de heces (Hpg) fue estimada para cada oveja los días 28, 56 y 70 post infección mediante conteo en cámara de McMaster.

La resistencia frente a los bencimidazoles se estimó mediante FECRT y mediante el test de eclosión de huevos (EHA). El porcentaje de reducción del hpg (FECRT) se calculó a partir de los hpg estimados los días 56 (día de la última desparasitación) y 70 (14 días después). Las tasas se calcularon tanto individualmente como para el

conjunto de individuos de cada uno de los dos lotes siguiendo la fórmula de Kochapakdee et al. (1995). La prueba EHA se realizó siguiendo el protocolo estándar, si bien únicamente se preparó, además de los dos pocillos control, dos pocillos a dosis discriminante de tiabendazol (0,1 µg/ml) capaz de inhibir como mínimo el 99% de eclosión en cepas sensibles (Coles et al., 2006). Para la infección se utilizó una cepa de *H. contortus* con un nivel moderado de resistencia a los bencimidazoles (DE50 = 1,28 µg/ml de tiabendazol para la prueba EHA), con el fin de obtener tasas medias de reducción en la FECRT inferiores al 100% y facilitar su análisis estadístico.

El análisis de la variación de E y del hpg en función del plan de alimentación (A) y del tiempo (T) transcurrido entre ambos muestreos (día 28 y 56 post infección) se realizó mediante ANOVAs con medidas repetidas. En este caso los hpg tuvieron que ser previamente transformados a su log(+1), si bien la estimación de las medias y los intervalos de confianza al 95% de los valores reales fueron calculados posteriormente mediante bootstrapping.

Para el análisis de la variación de las FECRT individuales, de las tasas de eclosión de huevos en los pocillos control como un indicador de la viabilidad de los huevos (EHA_Control) y de la EHA a dosis discriminante de tiabendazol (EHA_D), se procedió al ajuste de un modelo MANOVA en el que estas tres variables fueron las variables dependientes y la alimentación el factor predictor. Posteriormente se procedió a un ajuste de un modelo ANOVA para cada una de las tres variables. A partir de estos últimos ANOVAs se realizó un análisis de componentes de la varianza con el fin de determinar el porcentaje de variación explicado por el factor alimentación para cada una de las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor medio de E fue significativamente mayor en el lote *ad libitum* que en el lote con alimentación racionada, si bien mostró una disminución significativa a lo largo del estudio similar en ambos lotes. No ocurrió así para el hpg, donde no se detectó ninguna diferencia significativa en función de la alimentación, del tiempo o de la interacción de ambos (Tabla 1).

Tabla 1. Media (intervalo de confianza del 95%) del espesor de grasa y músculo lumbar (E) y del número de huevos de *H. contortus* excretados (hpg).

		Lote <i>Ad libitum</i>	Lote racionado	A	T	A x T
E	Día 0	15,74 (13,19–18,29)	11,45 (10,0–12,91)	P<0,001	P=0,002	P=0,560
	Día 56	12,29 (9,90–14,69)	9,01 (7,69–10,32)			
Hpg	Día 28	3051 (1896–5125)	2239 (1700–2987)	P=0,652	P=0,503	P=0,438
	Día 56	4630 (3374–5745)	3519 (2764–4114)			

A: tipo de alimentación; T: tiempo entre muestreos.

Después de la desparasitación con albendazol, la FECRT (IC95%) en el lote alimentado *ad libitum* fue del 90,27% (79,24 – 94,60), claramente superior a la del lote con alimentación racionada que fue del 75,72% (66,77 – 84,79).

El análisis MANOVA detectó una variación significativa (P=0,006) de las tres variables dependientes en función del lote de alimentación. Los análisis univariantes (Tabla 2) mostraron una fuerte relación estadística de cada una de las variables con la alimentación. El valor medio de los FECRT individuales fue superior para el lote alimentado *ad libitum*, mientras que las tasas de eclosión de huevos en los pocillos control y con dosis discriminante de tiabendazol fueron superiores para el lote con alimentación racionada. Para las tres variables, el análisis de componentes de la varianza estimó que, respectivamente, el 17,6%, 16,0% y 19,8% de la variación observada estuvo asociada al factor alimentación.

Tabla 2. Medias (intervalo de confianza del 95%) de la tasas individuales de reducción fecal de huevos (FECRT) y de las tasas de eclosión en ausencia de antihelmíntico (EHA_Control) y en presencia de tiabendazol a concentración de 0,1 µg/ml (EHA_D).

	Lote <i>ad libitum</i>	Lote racionado	P univariante
FECRT	89,71% (78,94 – 94,61)	76,64% (68,17 – 84,13)	0,075
EHA_Control	76,61% (69,06 – 84,17)	86,37% (79,98 – 92,75)	0,053
EHA_D	78,72% (74,79 – 82,65)	87,20% (83,88 – 90,52)	0,002

Algunos autores han sugerido un posible cambio en la fisiología del parásito como causa de las variaciones en los niveles de resistencia. Nuestros resultados demuestran una marcada variación de la resistencia observada en función del estado nutricional del hospedador. Una posible explicación es que la respuesta inmune frente a los parásitos de las ovejas con mejor estado nutricional haya redundado en una menor vitalidad de los parásitos adultos y una menor viabilidad de los huevos, disminuyendo su resistencia al efecto del antihelmíntico.

Estos resultados indican que los niveles de resistencia medidos con algunas de las técnicas rutinarias vienen determinados no sólo por las características genéticas del parásito, sino también por otros procesos que pueden contribuir a incrementar sustancialmente la variabilidad de tales estimaciones. Por este motivo es necesario identificar tales factores cuantificando su efecto sobre la resistencia observada, así como incrementar la cautela a la hora de interpretar los valores de prevalencia de la resistencia, pues, en vista del fuerte componente de variación que pueden incluir estos factores no controlados, la posibilidad de detectar falsos positivos podría ser más elevada de lo asumido hasta ahora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coles, G.C., et al. 2006. *Vet. Parasitol.* 136: 167-185.
- Jabbar, A., et al. 2006. *Life Sci.* 79: 2413-1431.
- Kochapakdee, S., et al. 1995. *Vet. Rec.* 137: 124-125.
- Valderrábano, J., et al. 2002. *Vet. Parasitol.* 104: 327-338.

Agradecimientos: El presente trabajo ha sido cofinanciado por los proyectos INIA_MEC. RTA2006-00183-C03-01 y RTA2006-180-00-00.

EFFECT OF NUTRITIONAL STATUS ON THE SUBSEQUENT RESISTENCE OF *Haemonchus contortus* TO BENCIMIDAZOLES IN SHEEP

ABSTRACT: A study was conducted to examine the effect of host nutrition on resistance levels of *H. contortus* to benzimidazoles estimated by faecal egg count reduction test (FECRT) after administration of Albendazol (5mg/hg) and egg hatch test (EHA) carried out with a single discriminant dosis of thyabendazol (0,1 µg/ml). Pregnant ewes were given access to lucerne pelleted diet either *ad libitum* or at approximately 0.70 of their maintenance requirements from the 35nd day of pregnancy in order to achieve a clearly differentiated level of body reserves by the 90th day of pregnancy, when all ewes in both groups received 5000 infective larvae of *H. contortus*. Then, all animals were put on the same plane of nutrition till the end of the study. Estimation of anthelmintic resistance was performed in day 56th after infection.

The animal fat back showed a significant effect on the subsequent measured resistance levels. Mean percentage reduction (95% confidence interval) of faecal egg counts was higher in *ad libitum* group 90,27% (79,24 – 94,60) than in restricted feed group 75,72% (66,77 – 84,79) whereas, accordingly, mean percentage of hatched eggs both in control and in thyabendazol added wells was higher in this last group. Results herein suggest that host immune response modulated by nutritional status can highly influence anthelmintic resistance measured by FECRT and EHA.

Keywords: anthelmintic resistance, energy restriction, sheep-nematoda,

CONTROL DE MIASIS Y ECTOPARASITOSIS EN CABALLOS EN SILVOPASTOREO

Cortiñas, F.J., Francisco, I., Arias, M., Sánchez, J.A., Francisco, R., Suárez, J.L., Mochales, E., Vázquez, L., Mula¹, P., Scala¹, A., Sánchez-Andrade, R. y Paz-Silva, A.

Epidemiología y Zoonosis, Parasitología y Enfermedades parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 27002-Lugo (Spain). E-mail: adolfo.paz@usc.es. ¹Università degli Studi di Sassari (Sardegna, Italia).

INTRODUCCIÓN

Los caballos mantenidos en régimen en extensivo, como el silvopastoreo, están expuestos a la infestación por diferentes parásitos artrópodos, entre los que destacan por su elevada frecuencia y patogenicidad las moscas *Hippobosca* y las garrapatas. También son muy importantes las infestaciones provocadas por moscas del género *Gasterophilus* cuyas larvas, vulgarmente conocidas como “reznos” son causantes de la gasterofilosis, miasis intestinal obligatoria y específica de los équidos domésticos (Lyons et al., 2000). Las especies más frecuentes, en especial entre los que permanecen mucho tiempo en espacios abiertos son *G. intestinalis*, *G. nasalis* y *G. haemorroidalis*.

En el presente estudio se analizó la presencia de estos parásitos en caballos en silvopastoreo, estableciéndose la relación con diferentes parámetros climáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el periodo comprendido entre enero de 2008 y enero de 2009, mensualmente se extrajo sangre a 5 caballos adultos de Pura Raza Galega procedentes de una explotación en régimen extensivo localizada en el NO de España. A partir del mes de mayo de 2008 y hasta finalizar el estudio se extrajo sangre también a 5 potros de la misma explotación. La sangre se extrajo de la vena yugular mediante tubos cerrados al vacío tipo Vacutainer, sin anticoagulante. Los sueros obtenidos se congelaron a -30 °C hasta su posterior procesamiento mediante la técnica ELISA.

Para conseguir antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Gasterophilus nasalis* se abrieron en sentido longitudinal cabezas de caballos sacrificados en un matadero local de Sassari (Cerdeña, Italia), Las larvas L2 se lavaron en tampón fosfato PBS, y se incubaron en RPMI a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 3 días, renovándose el medio cada 6-8 horas aproximadamente. El antígeno se pasó por un filtro de 0'22 µm y después se dializó.

Para la detección de anticuerpos (IgG) específicos frente a *Gasterophilus nasalis* se empleó un ELISA con antígeno a 2'5 µg/ml, sueros diluidos 1/250 en PTL, y como segundo anticuerpo anti-IgG de caballo marcado con peroxidasa (Nordic Immunology®) a una dilución de 1/2500 en PTL. El sustrato de la enzima estaba compuesto por orto-fenilendiamina, tampón citrato y H₂O₂. Las densidades ópticas se determinaron con un espectrofotómetro a 490 nm. Los resultados se presentaron como el valor medio de las absorbancias de todos los animales cada mes.

Para establecer el patrón climático de la zona de estudio, se recopilaron los valores mensuales de temperaturas máxima, mínima y media y días de lluvia de estaciones meteorológicas automatizadas de la provincia de Lugo. Los resultados se procesaron con Microsoft Excel 2003, y los análisis estadísticos con el SPSS 15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los anticuerpos frente a *G. nasalis* aumentaron gradualmente al final del invierno, probablemente debido a que las larvas 3 al desprenderse dejan úlceras en la mucosa del estómago, a través de ellas los antígenos parasitarios pueden alcanzar la circulación sistémica, y se estimula la producción de anticuerpos. A continuación descendieron hasta el final del verano, y las nuevas infestaciones (y por tanto a la presencia de las primeras fases larvarias) provocaron un nuevo aumento de anticuerpos hasta el final del estudio. Al

comparar estos datos con los obtenidos en los sueros de los potros, observamos que el modelo de respuesta inmunitaria era el mismo que en los caballos adultos, con un incremento de los valores de densidades ópticas.

Los niveles de absorbancia más bajos observados coinciden con la presencia de huevos (junio-noviembre) que pusieron las moscas adultas en el pelo de los animales, sin causar ningún estímulo antigénico (Agneessens et al., 1998).

Cuando el caballo ingiere los huevos y eclosionan las L1 se produce el desarrollo y la migración larvaria durante aproximadamente un mes (Cogley, 1989). En esta fase el estímulo antigénico es mayor y coincide con el aumento de las densidades ópticas observadas en los meses de otoño.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y que se observaron moscas de *Hippobosca* de junio a septiembre, y garrapatas *Ixodes* spp de junio a agosto, recomendamos la administración de un tratamiento endoectocida en mayo-junio, que eliminaría las fases adultas de ectoparásitos, y las L1 de *Gasterophilus*, y otro en octubre, que reduciría la migración de L2 de *Gasterophilus* y su transformación a L3.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cogley T.P. 1989. *Vet Parasitol.* 31: 317-331.
- Agneessens J., Engelen S., Debever P., Vercruysse J. 1998. *Vet Parasitol.* 77: 199-204.
- Lyons E.T., Swerczek T.W., Tolliver S.C., Bair H.D., Drudge J.H., Ennis L.E. 2000. *Vet Parasitol.* 92: 51-62.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado con **Fondos de Investigación ex 60% 2008** (Università degli studi di Sassari) y por la **Xunta de Galicia** (PGIDIT06RAG26102PR; 07MDS021261PR). Su desarrollo ha sido posible también gracias a la colaboración con las asociaciones de caballos *Cabalo de Pura Raza Galega* y Pura Raza Galega, "Granxa do Souto" y Grupoportichol.

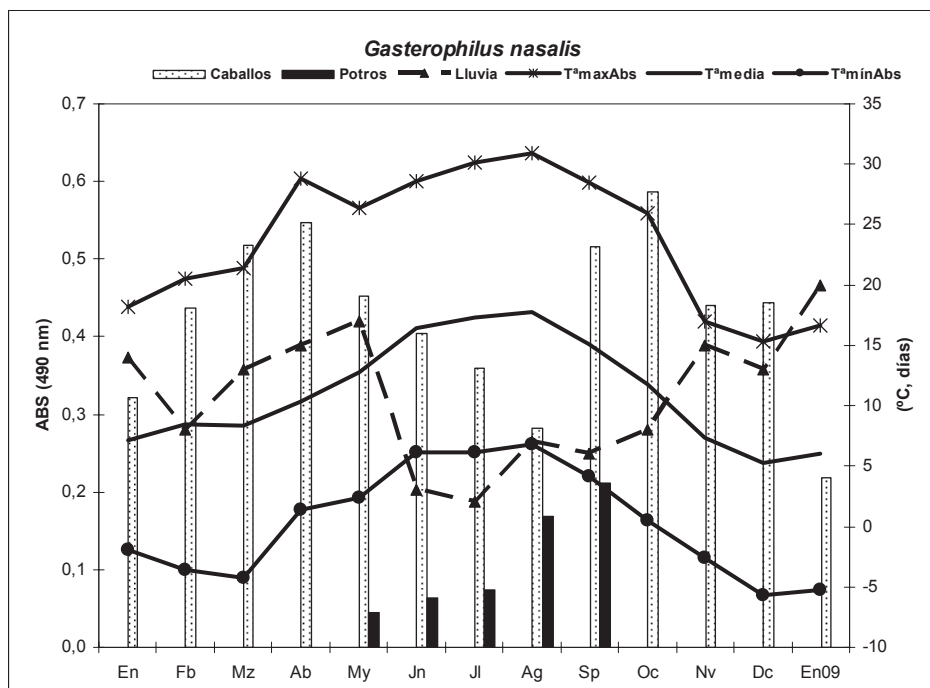


Figura 1. Respuesta inmunitaria humoral frente a *Gasterophilus nasalis* en caballos en pastoreo.

CONTROL OF MYIASIS AND ECTOPARASITOSIS IN SILVOPASTURING HORSES

ABSTRACT: Horses under silvopasture are affected by different parasitic arthropoda as the fly *Hippobosca* and ticks, which are very important due to their prevalence and pathogenic effects. It must be also noted that some flies are responsible for myiasis, as *Gasterophilus* spp. With the aim to gain more knowledge about the control possibilities of ectoparasitosis and myiasis in silvopasturing horses, one equine farm was monthly visited throughout the 2008 year. The animals were examined for the presence of ectoparasites and *Gasterophilus* eggs. Blood samples were also collected to evaluate the immune response against L2 *Gasterophilus* excretory/secretory antigens. Our results led us to suggest two treatments/year, in may-june and in october.

Keywords: *myiasis, ectoparasitosis, control, silvopasture horse*

EVOLUCIÓN ESTACIONAL DE LAS LARVAS DE *Rhinoestrus* spp EN CABALLOS MANTENIDOS EN UNA ZONA DE CLIMA MEDITERRÁNEO

Mula¹, P., Francisco, I., Arias, M., Cortiñas, F.J., Suárez, J.L., Sánchez, J.A., Romasanta, A., Paz-Silva, A., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R. y Scala¹, A.
Epidemiología y Zoonosis, Parasitología y Enfermedades parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 27002-Lugo (Spain). ¹Università degli Studi di Sassari (Sardegna, Italia). E-mail: scala@uniss.it.

INTRODUCCIÓN

Las formas larvarias de *Rhinoestrus* spp son parásitos obligados de los equinos, en cuyos senos nasales y laringe se desarrollan (Zumpt, 1965). La mosca está distribuida por Europa, Asia y África. Las larvas 1 (L1) son expulsadas durante el vuelo de las moscas en los ollares y zonas próximas a la cavidad nasal y a la boca. Penetran en las fosas nasales, se dirigen a los senos frontales o maxilares y se transforman en L2 y L3, que retornan a las fosas nasales, son expulsadas al medio por estornudos y caen al suelo. En esta ubicación pupan y al cabo de 4-5 semanas emerge la mosca adulta. La infección por larvas de *Rhinoestrus* puede provocar la inflamación de las cavidades nasales, senos y faringe, responsable de la aparición cuadros de rinitis, sinusitis crónica, disnea, etc. (Kaboret et al., 1997).

El clima mediterráneo se caracteriza por inviernos húmedos y templados, y veranos secos y calurosos, que facilitan el desarrollo y supervivencia de moscas responsables de miasis durante gran parte del año.

Con objeto de adquirir un mayor conocimiento de la rinoestrosis equina en áreas de clima mediterráneo, se desarrolló un estudio en Sassari (Cerdeña, Italia) en el que se analizó la evolución estacional de las larvas de *Rhinoestrus* en équidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el año de 2008 se recogieron larvas de *Rhinoestrus* spp de la cabeza de 229 caballos sacrificados en 3 mataderos de Cerdeña (Italia) (Arzana, Nulvi y Sarule). Se procedió a la apertura de las cabezas mediante un corte sagital.

Mensualmente, se recogieron datos climáticos a partir del Servizio Agrometeorologico Regionale (S.A.R), y con los parámetros de temperatura media, humedad relativa, radiación y velocidad del viento se estableció el modelo climático.

Los resultados se procesaron con Microsoft Excel 2003, y los análisis estadísticos con el paquete SPSS (15.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se representan los valores de los parámetros climáticos. Como se puede comprobar, en Cerdeña se dan las condiciones adecuadas para el vuelo de la mosca desde abril hasta noviembre.

La representación de las larvas obtenidas de las cabezas de los caballos se puede observar en la Figura 2. Se encontraron L1 en las cuatro estaciones del año, alcanzándose los valores máximos en otoño. La presencia de L2 se situó en primavera, verano e invierno, en tanto que la de L3 en primavera, verano y otoño.

El porcentaje de L1 experimentó un incremento significativo desde la primavera hasta el otoño, disminuyendo ligeramente a continuación. El porcentaje de L2 se mantuvo en un 40% en primavera y verano, y sólo un 10% en invierno. Finalmente, el mayor porcentaje de L3 se obtuvo en primavera, y en verano y otoño los valores fueron muy pequeños (1-2%).

Estos resultados parecen indicar que las condiciones climáticas en la isla Cerdeña favorecen la fase activa del ciclo endógeno del parásito, por lo que la presencia de L2 se centra especialmente en primavera y verano, y la de L3 en primavera. Es importante destacar que esta hipótesis se sustenta con el incremento de L1 de primavera a invierno, que señala la existencia de diferentes generaciones de moscas a lo largo del año. Además,

el elevado porcentaje de L1 cuando las condiciones externas son adversas (invierno) señala el desarrollo de la fase de diapausa.

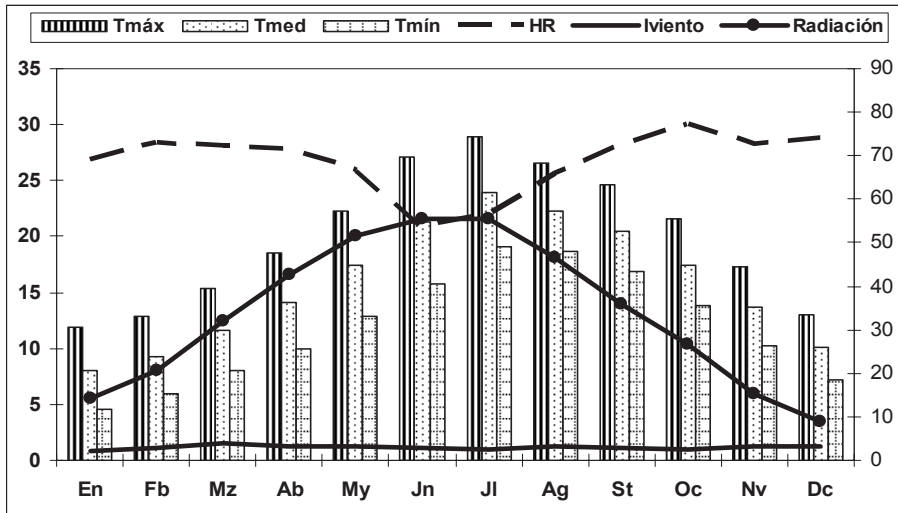


Figura 1. Parámetros climáticos durante el año 2008 en la región de Cerdeña (Italia).

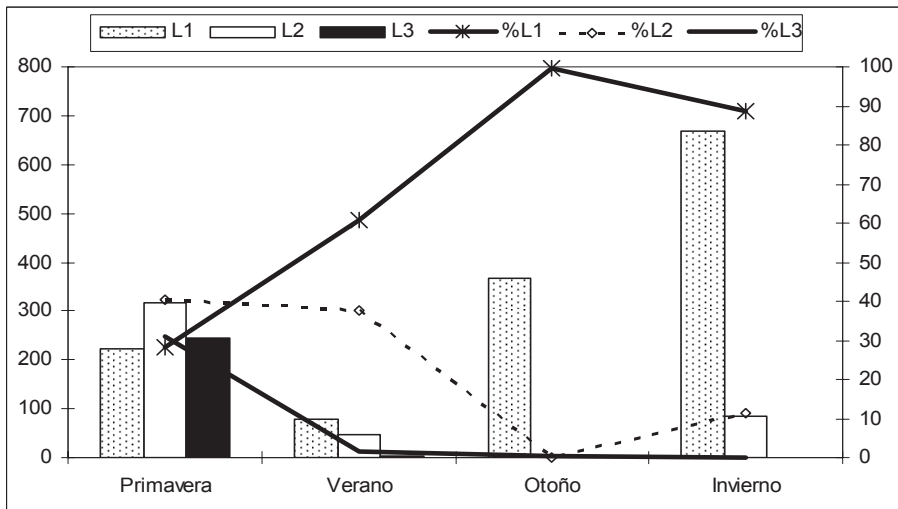


Figura 2. Variación estacional de los estadios larvarios de Rhinostirus spp en caballos en un área de clima mediterráneo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zumpt, F., 1965. Butterworths, London, UK. • Kaboret, Y., Deconinck, P., Pangui, J., Akakpo, J. and Dorchie, P., 1997. *Rev. Méd. Vét.* 148.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado con Fondos de Investigación ex 60% 2008 (Università degli studi di Sassari) y por la Xunta de Galicia (PGIDIT06RAG26102PR; 07MDS021261PR). Su desarrollo ha sido posible también gracias a la colaboración con las asociaciones de caballos *Cabalo de Pura Raza Galega* y Pura Raza Galega, “Granxa do Souto” y Grupoportichol.

SEASONAL EVOLUTION OF *Rhinoestrus* spp LARVAE IN HORSES UNDER MEDITERRANEAN CLIMATE

ABSTRACT: The larvae causing nasal myiasis in equids belong to the genus *Rhinoestrus*. Disease is characterized by irritation of the nasal cavities, sinuses and pharynx. In addition, injuries to the olfactory nerves with different degrees of clinical signs from asymptomatic to death of horses has been noted with reports of nervous symptoms characteristic of encephalomyelitis following penetration of the ethmoid bone and the soft cerebral membrane. Our results seem to indicate that climatic conditions enhance the active phase of the endogenous cycle throughout the year (excluding winter) so the risk for infestation is elevated in equids from a Mediterranean climate area.

Keywords: nasal myiasis, equine, Mediterranean climate, chronobiology

EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR ESTRÓNGILOS EN ÉQUIDOS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EXTENSIVA DE GALICIA: PERIODOS DE RIESGO.

Francisco, I., Arias, M., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Mochales, E., Mula¹, P., Suárez, J.L., Prado, J., Uriarte², J., Díez-Baños, P., Sánchez, J.A., Sánchez-Andrade, R. y Paz-Silva, A. Epidemiología y Zoonosis, Parasitología y Enfermedades parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 27002-Lugo (Spain). ¹Università degli Studi di Sassari (Sardegna, Italia). ²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA, Zaragoza, Spain). E-mail: adolfo.paz@usc.es.

INTRODUCCIÓN

En la Comunidad Autónoma Gallega, la explotación extensiva de caballos contribuye al mantenimiento económico de las explotaciones agrícolas unifamiliares y constituye un factor esencial para la gestión sostenible de las masas forestales, al ejercer una labor de limpieza y control del matorral y por tanto de la masa biocombustible. Los efectos beneficiosos de esta actividad han llevado al Gobierno Autónomo a habilitar una línea de subvenciones a la cría caballar, que está vinculada, entre otros, a la realización de controles antiparasitarios. Sin embargo, la ausencia de estudios epidemiológicos de las infecciones parasitarias de la especie equina en la región, pueden anular los beneficios esperados del control e incluso pueden ser motivo de aparición de resistencias a los fármacos utilizados.

La problemática anterior ha dado lugar en los últimos años, a algunos estudios sobre epidemiología y control, que han demostrado la importancia de las gastroenteritis parasitarias tanto por pequeños estróngilos, *Cyathostominae*, *Poteriostomum*. y *Gyalocephalus* spp. como por grandes, *Strongylus* spp. y *Triodontophorus* spp., en la cría de caballos en Galicia.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los períodos de riesgo potencial de infección por nematodos gastrointestinales en sistemas extensivos de producción equina de Galicia, a través del estudio del ritmo de excreción de huevos en las heces de caballos en pastoreo y de la evolución de la contaminación del pasto por larvas infectantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó entre los meses de enero y diciembre de 2008, en una explotación situada en el término municipal de Muras (Lugo). La explotación mantenía un núcleo de caballos autóctonos de Pura Raza Galega, mediante el sistema tradicional de pastoreo extensivo a lo largo de todo el año y no recibió ningún tratamiento antiparasitario a lo largo de todo el estudio.

Con periodicidad mensual se tomaron muestras de heces a 20 caballos seleccionados al azar de edades comprendidas entre 4 y 12 años para determinar, mediante el método de McMaster, la eliminación de huevos de estróngilos por gramo de heces (hpg). Con la misma periodicidad se tomaron muestras de pasto, mediante la técnica de la W de Taylor (Taylor, 1939), con objeto de valorar la población de larvas infectantes de estróngilos disponibles en las áreas de pastoreo. La extracción de las larvas se realizó mediante la técnica de Gruner y Raynaud (1980), expresándose los resultados en larvas por kg de materia seca de pasto (l/kg).

Para establecer el patrón climático de la zona de estudio, se utilizaron los valores mensuales de temperaturas máxima y mínima, precipitación y humedad relativa de 20 estaciones meteorológicas automatizadas situadas en distintos puntos de la provincia de Lugo.

Los resultados se procesaron con Microsoft Excel 2003, y la eliminación de huevos con el paquete estadístico SPSS (15.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las temperaturas más elevadas se observaron en agosto, y las más bajas en diciembre. Las precipitaciones fueron más abundantes entre noviembre y mayo y escasas entre junio y octubre (Figura 1).

La eliminación de huevos de estróngilos (Figura 1) disminuyó de forma significativa desde el mes de enero comprobándose los valores más reducidos, inferiores a 100 hpg, en marzo y

abril ($F= 6,233, P=0.001$). A partir de mayo aumentó de nuevo la eliminación y en el mes de julio se detectó el mayor número de huevos por gramo de heces, alcanzándose valores medios próximos a 800 hpg. Posteriormente, entre los meses de agosto y diciembre las excreciones se mantuvieron en valores medios comprendidos entre 348 a 560 hpg. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios similares por Ramsey et al. (2004) y Kuzmina et al. (2006) y sugieren que en sistemas de pastoreo extensivo de Galicia los caballos alcanzan infecciones subclínicas que comprometen su productividad.

Las larvas infectivas del pasto tuvieron una presentación estacional, apareciendo regularmente y con mayor abundancia en los meses del otoño en que la temperatura se situó por encima de 10°C , considerados por Mfitilodze y Hutchinson (1987) como umbral mínimo para el desarrollo. Durante el resto del año la presencia de larvas fue muy irregular, desapareciendo totalmente o en su práctica totalidad del pasto en los meses fríos del invierno ($T^{\text{a}} < 10^{\circ}\text{C}$) y en los meses de verano con la falta de humedad (Figura 1).

El brusco aumento de la excreción de huevos experimentada por los animales en el mes de mayo, tras un periodo de ausencia prácticamente total de contaminación larvaria del pasto, sugiere que entre los meses de diciembre y abril se produjo un fenómeno de hipobiosis en la mucosa intestinal, similar al descrito por Love y Duncan (1992) en respuesta a factores ambientales adversos para el desarrollo externo de los parásitos. En el presente trabajo el estímulo desencadenante del fenómeno podría ser el descenso de la temperatura.

Los resultados del presente estudio indican que en los sistemas de producción extensiva de caballos en Galicia, el otoño constituye el periodo favorable para el desarrollo de las fases de vida libre y el de mayor riesgo de infección de los animales en pastoreo. Asimismo sugieren la existencia de un fenómeno de hipobiosis que jugaría un importante papel en la epidemiología de la infección, al asegurar la supervivencia de los parásitos en las épocas desfavorables del invierno y primavera.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, consideramos que para el control de las estrongilosis equinas en Galicia resultaría idóneo instaurar dos tratamientos anuales. En primavera, coincidiendo con el final de la hipobiosis para evitar el desarrollo a estrongilos adultos, con lo que disminuiría la eliminación de huevos y como consecuencia la contaminación larvaria del pasto en verano. Como los caballos se reinfectan en el verano, un segundo tratamiento en septiembre-octubre eliminaría los adultos y por tanto reduciría la presencia de larvas en el pasto durante las estaciones de invierno y primavera.

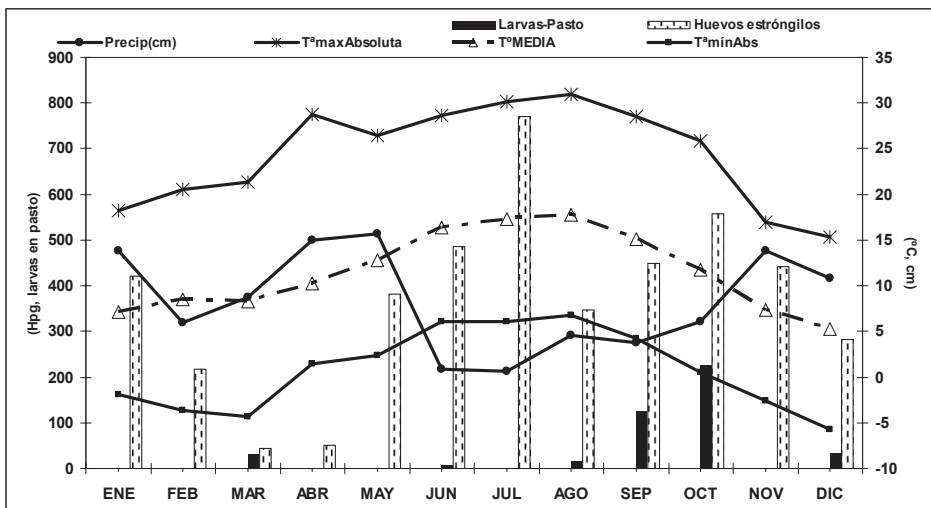


Figura 1. Modelo de eliminación de huevos de estrongilos y presencia de L3 en el pasto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Kuzmina T.A., Kuzmin YI, Kharchenko V.A. 2006. *Vet Parasitol.* 141: 264-272. ● Love S., Duncan J.L. 1992. *Vet Parasitol.* 44: 127-142. ● Gruner L., Raynaud, J.P., 1980. *Rev.Med.Vet.*,131: 521-529. ● Mfitlodze M.W., Hutchinson G.W. 1987. *Vet Parasitol.* 23: 121-133. ● Ramsey Y.H., Christley R.M., Matthews J.B., Hodgkinson J.E., McGoldrick J., Love S. 2004. *Vet Parasitol.* 119: 307-318. ● Taylor, E.L., 1939. *Parasitology* 31:473-478

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por la Xunta de Galicia (PGIDIT06RAG26102PR; 07MDS021261PR), y realizado en colaboración con las asociaciones de caballos *Cabalo de Pura Raza Galega* y Pura Raza Galega, "Granxa do Souto" y Grupoportichol.

EPIDEMIOLOGY OF STRONGYLE INFECTION IN SILVOPASTURING HORSES FROM GALICIA: RISK PERIODS

ABSTRACT: The aim of the current investigation was to assess the seasonal variations on the egg-excretion of strongyles in horses and on the presence of infective larvae on pasture. For this purpose, fecal samples were monthly recovered from 20 autochthonous Pura Raza Galega horses, and pasture samples also.

We concluded that two treatments would be helpful for controlling strongyle nematode in pasturing horses. Firstly in spring, at the end of the hypobiosis, to avoid worms develop to the adult stage, reducing thus egg-excretion and consequently larval contamination of pastures during summer. By considering the risk of infection in summer, a second treatment in September-October would eliminate the adult worms and could limit the presence of larvae during winter and spring.

Keywords: strongyle, equine, seasonal variations, climate.

INVESTIGACIÓN DE *Trichinella* spp. EN ZORROS DE CATALUNYA

Fàbregas i Comadran, X.¹, Colomer Giner, A., Alemany i Capella, A., Vila Puigdevall, C., Nogal, J.J., Bolás-Fernández, F. y López Claessens, S.

¹Vidal i Graners, 28, 1r 2a, 08173- Sant Cugat del Vallès. xfabregues@hotmail.com

INTRODUCCIÓN.

En Europa, la triquinosis ha sido descrita en las pasadas décadas como una zoonosis emergente y/o reemergente, con 779 casos humanos confirmados en los estados miembros en 2007, de los cuales 29 lo fueron en España (EFSA, 2009). En el último decenio, los brotes humanos por consumo de carnes de caza se están dando en países como Francia, cuando se han utilizado valores de temperatura/tiempo en la congelación (Gari-Toussaint et al., 2005) y en la cocción (Ranque et al., 2000), que no destruyen el parásito. Las especies *Trichinella britovi*, *Trichinella nativa* y *Trichinella genotipo T6* han demostrado resistencia a la congelación en carnes de caza (EFSA, 2009).

En los países mediterráneos, el zorro, carnívoro oportunista, es el reservorio primario en el ciclo silvestre (Pozio et al., 1996; 1998; 2009). En Europa, por razones medioambientales, es también la especie diana de las investigaciones epidemiológicas sobre *Trichinella* spp. (Balestrieri et al., 2007). El estudio de *Trichinella* spp. en esta especie, puede compensar las escasas declaraciones oficiales de jabalíes con triquina que notifican los veterinarios clínicos. Sin embargo, sería interesante establecer la relación epidemiológica existente entre zorros y jabalíes como reservorios de *Trichinella* spp., a fin de comprobar si el zorro puede ser un buen indicador de la triquinosis en jabalí, principal vía de transmisión al hombre desde el ciclo silvestre.

El Reglamento 2075/2005 regula el control oficial de la presencia de triquinas en las carnes de consumo. En la investigación de triquinas, la fiabilidad en la detección depende del músculo de elección en la especie animal diana, del peso de la muestra de carne, del grado de infestación (larvas por gramo / LPG) y del método de investigación empleado (Fàbregas y de Benito, 2001).

El objetivo de este trabajo es localizar y caracterizar muestras positivas a *Trichinella* spp. mediante el proceso siguiente: 1. Detectar el mayor número posible de larvas/quistes de *Trichinella* spp. en muestras musculares de zorro, con el método de digestión y con el examen triquinoscópico en placas de compresión, para conocer la prevalencia de la infestación. En los procedimientos se tendrán en cuenta las especificaciones descritas en el reglamento citado y las limitaciones impuestas por los pesos de las muestras obtenidas. 2. Cuantificar el grado de infestación de las muestras positivas. 3. Determinar los municipios y las comarcas de procedencia de las muestra positivas, para elaborar un mapa epidemiológico de las especies de *Trichinella* spp. en Catalunya. 4. Identificar taxonómicamente las especies de *Trichinella* spp. localizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Las 286 muestras congeladas a -18° C, de músculo tibial anterior (*musculus tibialis anterior*) de zorro (*Vulpes vulpes*), proceden del programa de control de predadores en cotos de caza de Catalunya. Son muestras recogidas en el período 2002-2006. Este músculo es, entre otros, de elección para la detección de *Trichinella* spp. en zorros (Kapel et al., 2005). Las muestras están identificadas individualmente y correlacionadas con los principales datos biológicos (sexo, edad aproximada, estado de carnes y lesiones) y geográficos (municipio, comarca y fecha de captura y de necropsia) de los animales de procedencia, en un archivo Excel. Otro material utilizado: carne de cerdo comercial (negativa a triquinosis) para completar el peso total de muestra (100 gramos (g) de carne) en las digestiones, si fuera necesario; fichas de control de las triquinoscopias y de las digestiones; nevera isotérmica para el transporte de muestras, congelador (-18° C) y equipo informático.

En la detección de triquinas participan 2 equipos: el A, formado por 3 veterinarios (de los cuales sólo 2 son examinadores de preparaciones) que pueden o no trabajar en colaboración, y el B, formado por un sólo veterinario. Todos ellos poseen experiencia acreditada en la detección de triquinas y han sido entrenados conjuntamente.

Las muestras se pesan con una balanza de precisión SARTORIUS ED 224S para conocer su peso neto, clasificarlas según este criterio (menor de 3 g, 3-5 g, 5-8 g y mayor de 8 g) y distribuir las según la comarca de origen. El instrumental, los reactivos utilizados y los procedimientos seguidos están reseñados en el capítulo I: Método de detección de referencia (Método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético) y en el capítulo III: Examen triquinoscópico, del anexo I: Métodos de detección y en el anexo III: Examen de animales distintos de los porcinos, del Reglamento (CE) nº 2075/2005. El equipo A utiliza un triquinoscopio de proyección marca OPTIC'S PEDRET de 60 aumentos (formato televisión) y el B, el modelo GT2000A de la misma marca, de 60x y 100x.

Para optimizar los resultados, la metodología que se sigue es: 1.1. Digestión inicial de hasta 20x5 g, de las muestras de más de 5 g. 1.2. En caso de detección de positivos en la visualización, identificación individual del positivo por triquinoscopia en placas de compresión, con el resto de la muestra. 2.1. Con las muestras de menos de 5 g, la detección individual se hace directamente por triquinoscopia de placas. 2.2. Se lleva a cabo un retrocontrol final por digestión de estas últimas muestras con resultado negativo, con la carne reciclada de las placas, si es necesario, y se conserva, en lo posible, un resto de carne para la técnica molecular.

De los positivos identificados individualmente, se envía muestra en fresco para la identificación molecular de la especie implicada por la técnica ISSR-PCR (Manzano-Lorenzo et al., 2008), al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existían dos antecedentes: un positivo en Argençola y otro en Llés (la Cerdanya). En este estudio no se han analizado muestras de esta comarca. Los resultados obtenidos y los parámetros técnicos de la investigación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de las muestras positivas y parámetros técnicos de la investigación.

	EQUIPO A	EQUIPO B	
Zorros (n)	286		
Veterinarios (n)	1-3	1	
Municipio (Comarca/Com.)	Argençola (Anoia)	Tremp (Pallars Jussà)	
Altitud (m)	700	468	
Com. muestreadas/total Com. (n/n)	22/41	11/41	
Muestras + Com./total muestras Com. (n/n)	1/9	2/4	
Sexo (n)	1 hembra	2 hembras	
Edad (años)	6	3	
Estado de carnes	bueno	normal	
Lesiones	no	ectoparásitos	
Fecha captura	mayo 2002		
Densidad comarcal zorros (n/km ²)		0,29	
LPG compresión	21	23	
LPG (cámara contaje)		20	15
Quistes/fragmentos + placa 1 (n/n)	23/15 = 1,5		
Quistes/fragmentos + placa 2 (n/n)	21/15 = 1,4		
Quistes/fragmentos + placa 3 (n/n)	19/13 = 1,5		
ISSR-PCR		<i>T. britovi</i> <i>T. britovi</i>	
Preparación muestras (horas/h)	10		
Investigación (h)	90	70	
Digestión + visualización (n)	15	10	
Triquinoscopia compresión (n)	44	81	
Placas examinadas (n)	132	243	
Tiempo examen/placa (minutos)	8		
Coste material fungible: 2 euros/digestión			

La prevalencia hallada es del 1,05%, inferior a las halladas por otros autores en Extremadura, 3% / n=227 (Enrique Pérez-Martín et al., 2000), Guadalajara, 8,9% / n=67 (Criado-Fornelio, 2000) y la Rioja, 4,2% / n=70 (Manzano-Lorenzo et al., 2008).

Como recomendaciones técnicas para la toma de muestras en las necropsias de zorros, indicar que se debe diseccionar todo el diafragma y posteriormente: 1. Separar un peso mínimo de 10 g de diafragma para la investigación de *Trichinella* spp. encapsuladas y no encapsuladas. 2. Cortar 50 g complementarios de diafragma para posteriores análisis, según anexo III del reglamento. Para futuros estudios, debería valorarse previamente el efecto de los ciclos de congelación-descongelación durante el manejo analítico de las muestras para evitar sesgos en la visualización, por posible destrucción de larvas y quistes y/o disminución de su viabilidad.

Para concluir, insistir en que el peso de la muestra es el principal factor limitante a corregir para mejorar la fiabilidad de la técnica y destacar que se confirma un foco estable de prevalencia a *Trichinella* spp. en zorros en Anoia y que se detecta otro en el Pallars Jussà. Se recuerda también que la cocción tradicional (el estofado) hace seguro el consumo de carnes de caza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Balestrieri, A., Remonti, L., Prigioni, C. 2007. *Hystrix It. J. Mamm.* 18: 17-38.
- Criado-Fornelio, A., Gutiérrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-Gracia, E., Roldán-Soriano, M. A., Díaz-Sánchez, M. A. 2000. *Vet. Parasitol.* 92: 245-251.
- Fàbregas, X., de Benito, J. 2001. *Eurocarne* 94: 67-76. Madrid.
- Gari-Toussaint, M., Tieulié, N., Baldin, J. L., Dupouy-Camet, J., Delaunay, P., Fuzibet, J. G., Le Fichoux, Y., Pozio, E., Marty, P. 2005. *Eurosurveillance* 10: 117-188.
- Kapel, C. M. O., Webster, P., Gamble, H. R. 2005. *Vet. Parasitol.* 132: 101-105.
- Manzano-Lorenzo, R., Nogal-Ruiz, J.J., Fonseca-Salamanca, F., García-Sancho, R.N., Arroyo Díaz, J.M., Jiménez, S., Fàbregas, X., Colomer, A., Bolás-Fernández, F., Martínez-Fernández, A.R. 2008. 4th Annual Scientific Meeting of MED-VET-NET. Saint-Malo. France.
- Enrique Pérez-Martín, J., Serrano, F. J., Reina, D., Mora, J. A., Navarrete, I. 2000. *J. Wildl. Dis.* 36: 531-534.
- Pozio, E. 1998. *Parasitol. today* 14: 35-38.
- Pozio, E., La Rosa, G., Serrano, F.J., Barrat, J., Rossi, L. 1996. *Parasitol.* 113: 527-533.
- Pozio, E., Rinaldi, L., Marucci, G., Musella, V., Galati, F., Cringoli, G., Boireau, P., La Rosa G. 2009. *Int. J. Parasitol.* 39: 71-79.
- Ranque, S., Faugère, B., Pozio, E., La Rosa, G., Tamburrini, A., Pellissier, J.-F., Brouqui, PH. 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 543-547.
- UE. 2005. Reglamento (CE) nº 2075/2005. *DOCE L* 338: 60-78.
- UE. 2009. *EFSA J.* 223.

INVESTIGATION OF *Trichinella* spp. IN FOXES IN CATALONIA

ABSTRACT: The presence of *Trichinella* spp. was investigated in 286 frozen samples of *musculus tibialis anterior* of foxes (*Vulpes vulpes*) in Catalonia. The samples were classified according to weight. In those weighing more than 5 g, the presence of *Trichinella* was detected by the method of artificial digestion. With the positive findings, individual identification was carried out by trichinoscopic examination on a compression plaque. On samples weighing less than 5 g, individual detection was made directly by compression trichinoscopy. A final retro control by artificial digestion was carried out on these latter samples with negative results. The molecular identification of the *Trichinella* species involved was performed using the ISSR – PCR technique.

Three positive samples were detected (prevalence equals 1.05%) in the areas of Anoia and Pallars Jussà. The molecular identification of the 2 samples from Pallars showed *Trichinella britovi* (20 LPG and 15 LPG). The rate of examination carried out by an expert was one compression plaque per 8 minutes. Technical recommendations were proposed for taking the samples. The investigation concludes that the weight of the sample is the main limiting factor and that two sources of prevalence exist in the above-mentioned areas.

Keywords: *trichinella*, investigation, fox, catalonia.

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR *Brucella microti*

Jiménez de Bagüés M.P.¹, Mitjana O.¹ y Köhler S.²

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930, 50059, Zaragoza. mpjimenezdebagues@aragon.es. ²Centre d'Etudes d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS) ; UMR 5236 Université de Montpellier I Pl. E. Bataillon cc110. 34095 Montpellier (Francia).

INTRODUCCIÓN

Brucella microti fue aislada por primera vez en el año 2000 durante el estudio de un episodio epizootico llevado a cabo en la especie *microtus arvalis* (campañol común europeo) en Moravia del Sur en la república checa (Hubalek et al., 2007). Sin embargo, no fue denominada como tal hasta 2008 tras un exhaustivo estudio taxonómico (Scholz et al., 2008). Este microorganismo se caracteriza por un crecimiento rápido en medios estándar y un perfil bioquímico similar al de *Ochrobactum anthropi* (Scholz et al., 2008). La patogenicidad de esta nueva cepa de *Brucella* había sido estudiada por Hubalek et al. (2007) en ratones ICR en unas experiencias llevadas a cabo con muy pocos animales por lo que no ha podido ser establecida de forma rigurosa. El objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de un modelo murino para el estudio de la virulencia de *B. microti* y su posible patogenicidad en este hospedador natural.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS UTILIZADAS: *Brucella microti* 4915S, *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M y *Brucella suis* 1330 se cultivaron en Blood Agar Base (BAB) a 37°C durante 18-24h. Las bacterias se recogieron en PBS, la suspensión se ajusto espectrofotométricamente a 10⁹ organismos/ml y se diluyó al décimo hasta alcanzar la concentración deseada. La dosis real se verificó posteriormente mediante dilución y recuento en placas de BAB.

Curva de crecimiento *in vitro* en Trypticase Soja Broth (TSB): se observó la densidad óptica medida como absorbancia a 600nm y la correspondiente concentración bacteriana de cultivos líquidos de diferentes cepas de *Brucella* en TSB durante 28 ó 32 horas.

ANIMALES: Experiencia dosis respuesta: Hembras Balb/c de 7-9 semanas de edad inoculadas con 10³ ó 10⁴ de *B. microti* por vía intraperitoneal (IP) y hembras CD1 de 7-9 semanas inoculadas IP con dosis desde 10⁵ a 10⁸ de *B. microti*. **Multiplificación *in vivo*:** hembras Balb/c, de 7-9 semanas de edad inoculadas con diferentes dosis de *B. microti* por vía IP. **Virulencia residual:** lotes de 32 hembras CD1 de 7 semanas se inocularon con 10⁸ufc de *B. microti* por vía subcutánea. En este último experimento se sacrificaron 8 animales de cada lote a las 3, 6, 9 y 12 semanas o a los 5, 10, 15 y 20 días postinoculación, y se extrajo el bazo para la determinación de la presencia de *Brucella* siguiendo la metodología descrita por Bosseray et al.1991. En las experiencias de multiplicación *in vivo* en el momento del sacrificio se extrajo asépticamente el bazo e hígado para el recuento de *Brucella* en los mismos siguiendo la metodología descrita por Jiménez de Bagüés et al. 1994 y en la de dosis respuesta se observo el número de animales muertos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la curva de crecimiento *in vitro* de las especies de *Brucella* estudiadas muestran una multiplicación mucho más rápida en medio líquido de *Brucella microti* respecto a *B. suis*, *melitensis* o *abortus* (Figura 1). *B. microti* tiene un tiempo de generación treinta minutos (dobla su numero cada 30 minutos) en plena fase logarítmica y alcanza su fase estacionaria o de meseta en 8-10 horas mientras que cepas más lentas como *B. melitensis* o *B. abortus* necesitan más de 24 horas para alcanzar dicha meseta. Este hecho es fundamental para comprender la dinámica de las curvas de multiplicación de *B. microti* en los órganos diana de elección en el animal de experimentación. En una primera experiencia se inocularon 33 hembras Balb/c con 10⁵ cfu de *B. microti* por vía IP, esta dosis es

considerada como inocua cuando se inoculan otras especies de *Brucella* como *B. suis* (Loisel-Meyer et al., 2006) en esta raza de animales. El 82% de los animales murió entre los días 3 y 7 postinoculación. Los animales presentaban inicialmente síntomas de fiebre, anorexia, decaimiento, y finalmente hipotermia y convulsiones antes de morir. Se realizó entonces una segunda experiencia para determinar la dosis subletal de *B. microti* en Balb/c. Lotes de hembras Balb/c se inocularon IP con 10^3 ó 10^4 cfu. Todos los animales sobrevivieron al experimento por lo que se determinó la utilización de 10^4 como dosis subletal en los experimentos de multiplicación en Balb/c. La curva de multiplicación esplénica y hepática de *B. microti* se muestra en la Figura 2 donde se observa como se multiplica rápidamente alcanzando, tanto en bazo como en hígado, un pico, máximo en el día 3 y una eliminación rápida a partir de dicha fecha, desapareciendo de ambos órganos en el día 21. Las especies clásicas de *Brucella*, presentan su máximo de multiplicación a partir de los 7 días, y una meseta posterior de varias semanas en la que los valores de *Brucella* en bazo se mantienen elevados, pudiéndose encontrar todavía microorganismos hasta 12 ó 18 semanas después de la inoculación (Edmonds et al., 2002). *B. microti* muestra, por lo tanto, un comportamiento radicalmente diferente al de otras especies de *Brucella* en este modelo. Posteriormente para testar una posible diferencia de susceptibilidad entre razas de ratones a la infección por *B. microti* se realizó una experiencia para determinar la dosis letal de dicha cepa en CD1 y para ello se inocularon lotes de 6 hembras CD1 con dosis desde 10^4 hasta 10^8 y se contabilizó el número de animales muertos. Una dosis de 10^6 causó un 83% de muertos mientras que 10^5 no causó ninguno. Existe por tanto una susceptibilidad mayor en ratones Balb/c que en CD1 a la infección por *Brucella microti*, 10^5 vs 10^6 reflejando una posible diferencia de sensibilidad en la naturaleza entre diferentes razas de roedores salvajes como el campañol, el ratón común, etc, todas ellas susceptibles a priori de ser infectadas por esta bacteria. Otro método para determinar la virulencia de una cepa de *Brucella* es la determinación de la virulencia residual o tiempo de recuperación 50, que mide el tiempo en el que un lote de animales infectados elimina *Brucella* de su bazo. En el caso de *B. microti* a las 3 semanas, primer punto del protocolo de la OIE para este tipo de experimento, todos los animales habían eliminado la bacteria de sus bazos, con lo que hubo que ajustar los intervalos de sacrificio a períodos más cortos: 5, 10, 15 y 20 días. Así pues la virulencia residual de *B. microti* fue de 17,5 días con un límite de confianza superior de 19,74 e inferior de 15,05 días, mientras que el RT50 para otras cepas de *Brucella* referenciadas es de 25,44 semanas para *B. abortus* 2308 y 7,78 semanas para *B. abortus* B19 (Sangari et al., 1998) o de 7,9 semanas para Rev1 (Bosserey et al., 1991). Estos resultados muestran que a pesar de la alta tasa de multiplicación y de la potencial virulencia exhibida en su hospedador natural, éste es capaz de eliminar la bacteria muy rápidamente, demostrando una adaptación innata de los roedores a este patógeno.

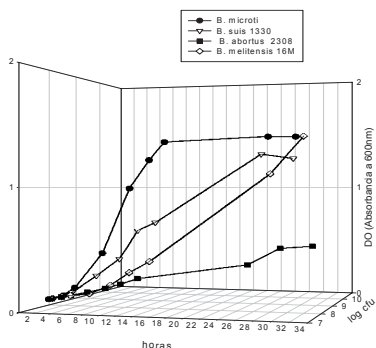


Figura 1: Curvas de multiplicación in vitro de *B. microti*, *B. suis* 1330, *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M en TSB y recuento bacteriano correspondiente.

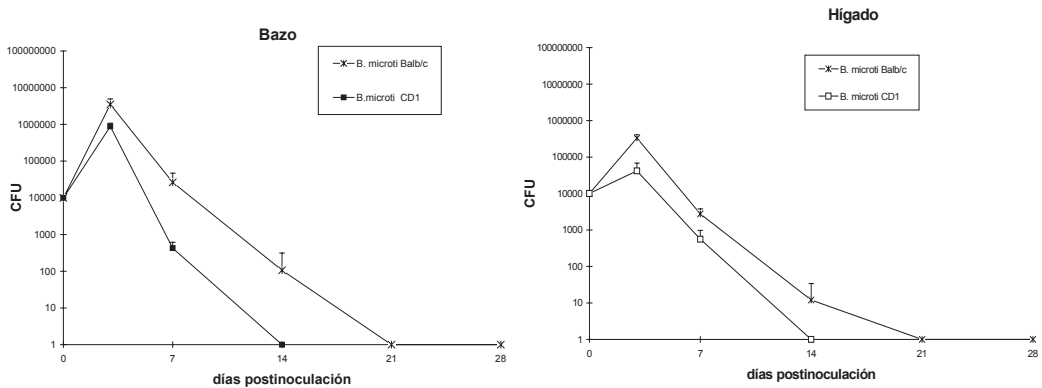


Figura 2. Curvas de multiplicación esplénica y hepática de *B. microti* en ratones Balb/c y CD1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

●Bosserey N. 1991. *Biolo.* 19: 355-363. ●Hubálek, Z.; Scholz, H. C.; Sedlacek, I.; Melzer, F.; Sanogo, Y. O.; Nesvadbova, J. 2007. *Vector-Borne Zoonot Dis.* 4: 679-687. ●Edmonds, M. D.; Cloeckert, A.; Elzer, P. H. *Vet Microbiol.* 88: 205-221. ●Jiménez de Bagüés, M.P.; Elzer, P. H.; Blasco, J. M.; Marín, C. M.; Gamazo, C.; Winter, A. J. 1994. *Infect and Immun.* 62: 632-638. ●Loisel-Meyer, S.; Jimenez de Bagues, M. P.; Basseres, E.; Dornand, J.; Kohler, S.; Liautard, J. P.; Jubier-Maurin, V. 2006. *Infect and Immun.* 74: 1973-1976. ●Sangari, F. J.; Grilló, M. J.; Jiménez de Bagüés, M. P.; González-Carreró, M. I.; García-Lobo, J. M.; Blasco, J. M.; Agüero, J. 1998. *Vaccine* 19: 1640-1645. ●Scholz, Holger C.; Hubalek, Zdenek; Sedlacek, Ivo; Vergnaud, Gilles; Tomaso, Herbert; Al Dahouk, Sascha; Melzer, Falk; Kampfer, Peter; Neubauer, Heinrich; Cloeckert, Axel; Maquart, Marianne; Zygmunt, Michel S.; Whatmore, Adrian M.; Falsen, Enevold; Bahn, Peter; Gollner, Cornelia; Pfeffer, Martin; Huber, Birgit; Busse, Hans-Jürgen; Nockler, Karsten. 2008. *Int J Syst Evol Microbiol.* 75: 375-382. ●Scholz, H. C. Hubalek, Z. Nesvadbova, J. Tomaso, H. Vergnaud, G. Le Fleche, P. Whatmore, A.M. Al Dahouk, S. Kruger, M. Lodri, C. Pfeffer, M., 2008. *Emerging Infect Dis.* 8: 1316-1317.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA2006-0070-0000

CHARACTERIZATION OF A MURINE MODEL FOR THE STUDY OF *B. microti* INFECTION

ABSTRACT: The aim of this work was to study the infection of *B. microti* in a murine model. *B. microti* at a dose of 10⁵ cfu/animal caused death when injected in Balb/c while did not when injected in CD1 mice. Moreover the lethal dose of *B. microti* for CD1 mice was 10⁶, showing a significant difference on susceptibility to these bacteria between mice strains. The splenic and hepatic curves of *B. microti* in Balb/c and CD1 mice showed a peak of multiplication at day 3 followed by a sharp descent until day 21 in which no bacteria were found. RT50 (recovery time 50) for *B. microti* was 17, 5 days, demonstrating a significant reduced persistency of *B. microti* in the host when compared with other *Brucella* species. The results showed here demonstrated the pathogenicity of *B. microti* in mice and the capacity of the natural host for dealing with the bacteria independently on the strain of rodent.

Keywords: *Brucella, microti, pathogenicity, virulence.*

RESISTENCIA A LA REINFECCION POR *Brucella microti* EN UN MODELO MURINO

Jiménez de Bagües M.P.¹, Mitjana O.¹

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930, 50059, Zaragoza. mpjimenezdebagues@aragon.es.

INTRODUCCIÓN

Brucella microti es un microorganismo recientemente descrito y caracterizado por primera vez (Hubalek et al., 2007; Scholz et al., 2008a) cuyo hospedador natural es un roedor salvaje llamado *Microtus arvalis* o campañol común europeo. A diferencia de otras especies "clásicas" de *Brucella*, *B. microti* se caracteriza por una multiplicación rápida en medios estándar (Jiménez de Bagües et al., 2009) y por un perfil bioquímico similar al de *Ochrobactrum anthropi*, un microorganismo filogenéticamente próximo a *Brucella* (Scholz et al., 2008). En 2007 *B. microti* fue aislada de los ganglios maxilares de dos zorros rojos en la región de la Baja Austria distante 130 Km del lugar donde se aisló *B. microti* por primera vez en el año 2000 (Scholz et al., 2008c). Además esta cepa se aisló de muestras de suelo de la misma zona donde fue aislada del campañol 7 años antes (Scholz et al., 2008b). Este hecho puede implicar, por un lado, la supervivencia y persistencia de la cepa en la naturaleza, incluso en condiciones extremas, pudiendo ser el suelo considerado como un reservorio natural de esta cepa y por otro lado, que los zorros, depredadores habituales de estos roedores, pueden haberse infectado al ingerir campañoles infectados demostrando así, que la zona prevalencia de *B. microti* comprende una amplia área desde Moravia del sur a la baja Austria. En las condiciones descritas, una especie susceptible de ser infectada sería el jabalí puesto que tiene por costumbre excavar y hurgar el suelo con su hocico. Otros depredadores posibles del campañol sano o enfermo son las aves rapaces, los felinos y canidos salvajes y los mustélidos, como comadreas, hurones y nutrias. Los mecanismos de infección y transmisión horizontal de *B. microti* no han sido estudiados todavía, si bien, algunos autores sugieren la posibilidad de que existan otros vectores de infección como los nemátodos, las garrapatas, o anélidos, que funcionen como reservorios. Un modelo murino para el estudio de esta infección ha sido establecido (Jiménez de Bagües et al., 2009) demostrando una elevada patogenicidad de la cepa en los animales estudiados, así como una diferencia de susceptibilidad a la infección dependiendo de la raza de animal utilizado en el estudio y de la dosis infectante. Los animales muertos son, a veces, devorados por sus congéneres sanos pudiéndose generar una infección o reinfección. De igual forma la practica usual del acicalamiento propio o de otros miembros de la colonia, y la ingestión de heces propias o ajenas así como los encuentros agresivos entre machos adultos puede llevar consigo una infección o reinfección debido a la alta patogenicidad de la cepa que implica, por un lado, una fuerte carga bacteriana del animal enfermo y por otro la posibilidad de dosis infectivas bajas. Todo ello sugiere que una población de campañoles puede estar sometida a constantes exposiciones a la bacteria. Se desconoce si un animal curado o convaleciente de una infección por *B. microti* es resistente a una reinfección posterior. El objetivo del presente trabajo, por tanto, es determinar si un animal infectado una primera vez por *B. microti* queda protegido frente a una reinfección con la misma cepa.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS: *Brucella. microti* 4915S, se cultivo en Blood Agar Base (BAB) a 37°C durante 18-24h. Las bacterias se recogieron en PBS, la suspensión se ajusto espectrofotométricamente a 10⁹ organismos/ml y se diluyo al décimo hasta alcanzar la concentración deseada. La dosis real se verificó posteriormente mediante dilución y recuento en placas de BAB.

ANIMALES: **Resistencia a la reinfección en Balb/c:** Experiencia 1: un lote de 6 hembras Balb/c de 7-9 semanas de edad supervivientes de una primera infección con una dosis letal de 10⁵ cfu de *B. microti* inoculada por vía intraperitoneal (IP) fueron reinfectadas 6 semanas más tarde con 10⁴ cfu de *B. microti* por vía IP, un lote control de igual número de animales recibió PBS como primera inoculación y 10⁴ cfu como segunda, vía IP. Tres días más tarde

se sacrificaron todos los animales y se extrajo asépticamente el bazo para el recuento de *Brucella* en los mismos siguiendo la metodología descrita por Jiménez de Bagüés et al. (1994). Experiencia 2: lotes de 6 ó 8 hembras Balb/c fueron inoculadas inicialmente con 10^4 cfu de *B. microti*, via IP, 2 lotes de igual número de animales fueron simultáneamente inoculados con PBS. Seis semanas más tarde los grupos de 6 animales fueron re infectados con 10^4 , mientras que los de 8 animales lo fueron con 10^6 cfu vía IP. Los dos primeros lotes fueron sacrificados 3 días más tarde para el recuento de *Brucella* en sus bazos mientras que en los lotes inoculados con 10^5 se observó el número de animales muertos en los primeros 14 días tras la re infección. **Resistencia a la re infección en CD1.** Experiencia 3: dos lotes de 8 hembras CD1, de 7-9 semanas de edad fueron inoculadas con 10^8 por vía subcutánea, y 2 lotes del mismo número de animales fue inyectado con PBS. 8 semanas más tarde se realizó una segunda infección con 10^5 ó 10^6 por via IP. Tres días mas tarde se sacrificaron todos los animales para el recuento de *B. microti* en sus bazos. Experiencia 4: lotes de 6 hembras CD1 de la misma edad que las anteriores se inocularon con dosis de 10^5 cfu de *B. microti* por vía IP o con PBS. Seis semanas más tarde todos los animales se inocularon con 10^7 cfu de la misma cepa por via IP. Se contabilizo el número de animales muertos en las dos primeras semanas tras la re infección. Los lotes infectados+re infectados se compararon con su respectivo lote control mediante un tes t Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos de resistencia a la re infección llevados a cabo en la raza Balb/c, la más susceptible a *B. microti* (Jiménez de Bagüés et al., 2009) se muestran en la Tabla 1. Los animales supervivientes de una dosis letal o los que han sido infectados con dosis subletales presentan una elevada resistencia a una re infección, 6 semanas más tarde, con una dosis no letal, ya que en los bazos de estos animales no se encontró *B. microti* mientras que en los de los animales control la carga bacteriana era superior a los dos millones de colonias. De igual modo una infección inicial con una dosis subletal protegió al 100% de los animales frente a una segunda infección, llevada a cabo 6 semanas más tarde con una dosis letal, ya que ningún animal del lote re infectado murió frente al 100% de mortalidad en el lote control. Los resultados obtenidos en la raza CD1, animales naturalmente más resistentes a la infección por *B. microti* se presentan en la Tabla 2. Los animales infectados inicialmente por vía subcutánea con 10^8 y re infectados con 10^5 o 10^6 CFU de *B. microti* por vía IP muestran una protección elevada frente a una segunda infección con la misma cepa llevada a cabo 8 semanas más tarde. De igual forma, animales CD1 inoculados IP con una dosis subletal de 10^5 quedaron completamente protegidos frente a una infección posterior con una dosis que mató al 100% de los animales controles. Estos resultados muestran que los roedores afectados por *Brucella microti* quedan protegidos de forma natural frente a posteriores re infecciones, lo que puede tener un importante significado epidemiológico en la diseminación de la infección en la población. Las condiciones de experimentación utilizadas en este trabajo implican la utilización de razas de ratones de laboratorio de diferente susceptibilidad a la infección por *B. microti*, ya que no se ha podido trabajar con poblaciones de campañoles. La transmisión de *B. microti* al hombre no ha sido establecida, pero no puede descartarse, ya que se ha descrito en Sibera un tipo de campañol que almacena hasta 20 kilos de raíces en su madriguera, raíces muy apreciadas que sirven de condimento alimenticio a los campesinos del lugar. Igualmente la carne de esta especie de roedor es ampliamente utilizada en restaurantes en China.

Tabla 1. Resistencia a la reinfección por *B. microti* en Balb/c tras una primera infección con la misma cepa realizada 6 semanas antes.

Lote	Dosis 1ª Infección IP 100µl	Nº animales	Dosis 2ª Infección IP 100µl	CFU /bazo (media ±SD)	% mortalidad
1	10 ⁵	6	10 ⁴	0 ^a	0
2	PBS	6	10 ⁴	2,37x10 ⁶ ±391.126	0
3	10 ⁴	6	10 ⁴	0 ^a	0
4	PBS	6	10 ⁴	2,88x10 ⁶ ± 574.223	0
5	10 ⁴	8	10 ⁶	ND	0
6	PBS	8	10 ⁶	ND	100

a: en comparación con el correspondiente grupo control P<0,001, ND: no determinado

Tabla 2. Resistencia a la reinfección por *B. microti* en CD1 tras una primera infección subcutánea o peritoneal con la misma cepa realizada 8 ó 6 semanas antes .

Lote	Dosis 1ª Infección ^{a,b} 100µl	Nº animales	Dosis 2ª Infección IP 100µl	CFU /bazo (media ±SD)	% mortalidad
1	10 ^{8a}	8	10 ⁵	1.241,25±2194 ^c	0
2	PBS	8	10 ⁵	3,71x10 ⁶ ±1.779.653	0
3	10 ^{8a}	8	10 ⁶	5.626,25±4685 ^c	0
4	PBS	6	10 ⁶	1,66x10 ⁷ ±12.601.183	0
5	10 ^{5b}	6	10 ⁷	ND	0
6	PBS	6	10 ⁷	ND	100

a: subcutánea 8 semanas antes, b: intraperitoneal 6 semanas antes

c: en comparación con el correspondiente grupo control P<0,001, ND: no determinado

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hubálek, Z.; Scholz, H. C.; Sedlacek, I.; Melzer, F.; Sanogo, Y. O.; Nesvadbova, J. 2007. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* 4: 679-687.
- Jiménez de Bagüés, M.P.; Elzer, P. H.; Blasco, J. M.; Marín, C. M.; Gamazo, C.; Winter, A. J. 1994. *Infect. and Immun.* 62: 632-638.
- Jiménez de Bagüés, M.P . Mitjana, O. Kohler S. 2009. *Proceedings de XIII Jornadas Producción Animal.*
- Scholz, et al. 2008a. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 75: 375-382.
- Scholz, H. C.Hubalek, Z. Nesvadbova, J. Tomaso, H. Vergnaud, G. Le Fleche, P. Whatmore, A.M. Al Dahouk, S. Kruger, M. Lodri, C. Pfeffer, M., 2008b. *Emerging. Infect. Dis.* 8: 1316-1317.
- Scholz, H. Hofer E., Vergnaud, G., Le Fleche, P. , Whatmore, A.M. , Al Dahouk, S., Pfeffer, M. , Kruger, M., Cloeckert A., Tomaso, H. 2008c. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8: 1316-1317.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA2006-0070-0000

RESISTENCE TO REINFECTION WITH *B.microti* IN A MURINE MODEL OF INFECTION

ABSTRACT: The aim of this work was to determine whether an animal recovered from a primary infection with *B. microti* was protected against a re-infection with the same strain in the murine model. After an initial infection with *B. microti*, Balb/c mice displayed a high level of resistance to re-infection with lethal or non lethal doses of *B. microti*. CD1 mice primed subcutaneously with high doses of *B. microti* were protected against an IP challenge of 10⁵ or 10⁶ cfu/animal 8 weeks later. In addition, all CD1 mice exposed initially with 10⁵ cfu/animal IP and re-infected 6 weeks later by the same route with a lethal dose survived compared to a 100% mortality in the controls.

Keywords: *Brucella, microti, protection, immunity.*

INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA PARASITACIÓN POR NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN CORZOS (*Capreolus capreolus*) DE GALICIA.

Vázquez, L., Dacal, V., Pato, F.J., Díaz, P., Fernández, G., Suárez, J.L., Mochales, E., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Díez-Baños, P. y Morrondo, P.

Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Dpto. Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo. franciscoj.pato@rai.usc.es

INTRODUCCIÓN

En estudios previos (Díez-Baños et al., 1995; Morrondo et al., 2008) comprobamos que los nematodos gastrointestinales son las infecciones parasitarias más comunes de los corzos en Galicia. Además, otros autores (Molan et al. 2002; Niezen et al., 2002) han observado que ovejas alimentadas con forrajes con elevado contenido en taninos condensados, reducían el número de huevos de nematodos gastrointestinales eliminados.

La alimentación del corzo cambia con las estaciones del año, alimentándose esencialmente de herbáceas en verano y de hojas y arbustos (con alto contenido en taninos condensados) durante el resto del año, especialmente en otoño e invierno (Fandos et al., 1987).

Basándonos en estos antecedentes, el objetivo que nos proponemos es confirmar si la dieta de los corzos capturados en las distintas estaciones del año está relacionada con la prevalencia e intensidad de infección por nematodos gastrointestinales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desde mayo de 2007 a octubre de 2008 se obtuvieron muestras individuales de heces del intestino de 367 corzos abatidos en diferentes cotos de caza de Galicia. Las muestras se obtuvieron en primavera (57 muestras), verano (68 corzos) y otoño (242 ejemplares) que son los periodos en los que se permite su caza en Galicia.

Se realizaron los correspondientes análisis coprológicos individuales, mediante flotación en solución salina y cultivo fecal (MAFF, 1986). Posteriormente, mediante el examen microscópico se calculó el número de huevos por gramo de heces (hpg) de cada animal y se identificaron los géneros de nematodos gastrointestinales presentes (MAFF, 1986).

Las principales especies vegetales que consume el corzo en las zonas de estudio son: *Rubus ulmifolius*, *Vaccinium myrtillus*, *Quercus pyrenaica*, *Chamaespartium tridentatum*, *Anemone nemorosa*, *Daboecia cantabrica* y *Quercus robur*. Asimismo, se ha observado variaciones estacionales en la composición de la dieta del corzo, caracterizadas por un mayor ingesta de plantas herbáceas en primavera y verano, si bien en las cuatro estaciones el consumo de plantas arbustivas supera al de herbáceas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la mayoría de los análisis coprológicos (67%) se observaron huevos de nematodos gastrointestinales. Los géneros identificados en orden decreciente de prevalencia fueron: *Spiculopteragia* spp. (48,2%), *Ostertagia* spp. (41,2%), *Nematodirus* spp. (7,3%), *Trichostrongylus* spp. (2,9%), *Trichuris* spp. (<1%), *Oesophagostomum* spp. (<1%), *Cooperia* spp. (<1%) y *Chabertia* spp. (<1%).

Al relacionar la prevalencia e intensidad de infección por estos parásitos con la época en la que se capturaron los animales, se observó que fue superior en verano (78%; \bar{x} = 158 hpg) y menor en otoño (66%, \bar{x} = 132 hpg) y primavera (57%, \bar{x} = 102 hpg)

Según González-Hernández et al. (2003), en Galicia las plantas que poseen mayor concentración de taninos condensados (miligramos de equivalente de ácido tánico por gramo de peso seco, TAE/g) son *Rubus ulmifolius*, *Quercus pyrenaica* y *Quercus robur*. Además, según Fandos et al. (1987), los corzos comen estas plantas durante todo el año aunque en mayor proporción en otoño e invierno.

Al relacionar el porcentaje de infección por nematodos gastrointestinales con el contenido de taninos condensados que ingieren los corzos en cada estación (Figura 1), se observó que el

porcentaje de infección es considerablemente inferior en otoño e invierno que coincide con los periodos en que la alimentación contiene mayor cantidad de taninos condensados. Estos resultados coinciden con los de Niezen et al. (2002) y Molan et al. (2002) cuando administraron forrajes ricos en taninos condensados en la dieta de corderos infectados experimentalmente con *Trichostrongylus colubriformis*, y comprobaron que además reducía la viabilidad de los huevos y en consecuencia la contaminación de los pastos era menor.

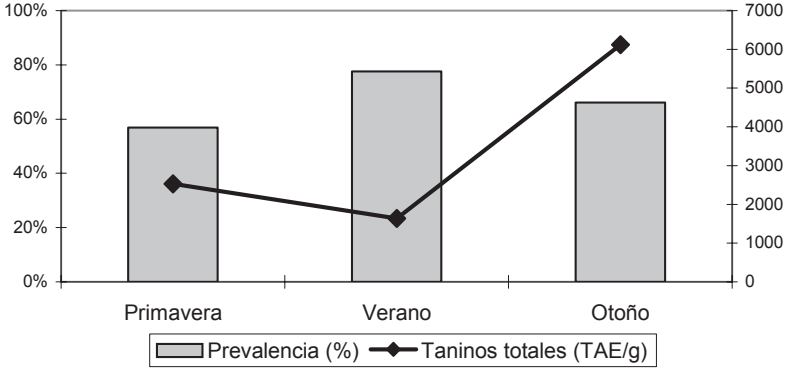


Figura 1. Comparación entre la prevalencia de infección por nematodos gastrointestinales y el contenido en taninos condensados de la dieta

Como se observa en la figura 2, el recuento de huevos de nematodos gastrointestinales mostró una tendencia opuesta a la concentración de taninos condensados en la dieta, es decir con menor eliminación en otoño coincidiendo con mayor ingesta de taninos condensados.

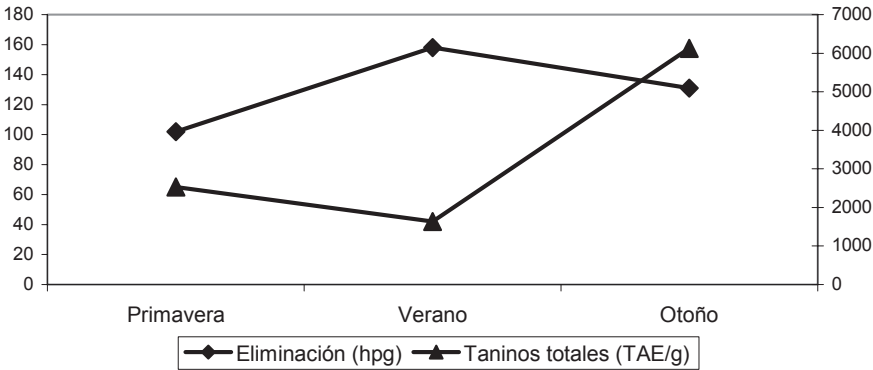


Figura 2. Relación entre la eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales y el contenido en taninos condensados de la dieta

Estos resultados coinciden de nuevo con lo obtenido por Niezen et al. (2002) y Molan et al. (2002) quienes comprobaron que la fecundidad de las hembras de los nematodos gastrointestinales era menor en las ovejas que recibieron la dieta con mayor proporción de taninos condensados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Díez-Baños, N., Carrillo-González, E., López-Almarza, J., Morrondo-Pelayo, P., Díez-Baños, P. 1995. *Seventh International Helminthological Symposium*. Košice, Slovak Republic.
- Fandos, P., Martínez, T., Palacios, F. 1987. *Ecología* 1: 161-186.
- González-Hernández, M.P., Karchesy, J., Starkey, E.E. 2003. *J Range Manage.* 56: 461-465.
- MAFF. 1986. *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin N°18*, London, HMSO, 2-67.
- Molan, A., Waghorn, G., McNabb, W. 2002. *Vet Rec.* 150: 65-69.
- Morrondo, P., Vázquez, L., Pardo, M., Dacal, V., Díaz, P., Paz, A., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., Uriarte, J., Díez-Baños, P. 2008. *XVI Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants. Zadar, Croatia.*
- Niezen, J., Charleston, W., Robertson, H., Shelton, D., Waghorn, G., Green, R. 2002. *Vet Parasitol.* 105: 229-245.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el Proyecto de Investigación FAU2006-00006-00-00 (I.N.I.A.) y por el proyecto de investigación 07MRU034261PR (Xunta de Galicia). Queremos manifestar nuestro agradecimiento a todos los cazadores gallegos que nos han facilitado la recogida de muestras.

DIET INFLUENCE ON GASTROINTESTINAL NEMATODE INFECTION IN GALICIAN ROE DEER (*Capreolus capreolus*)

ABSTRACT: The relationship between tannin content in roe deer diet and gastrointestinal nematode prevalence and intensity of egg-excretion was studied. Most of the roe deer (67%) excreted gastrointestinal nematode eggs. Prevalence and egg-output were higher in summer than in autumn and spring. When the possible correlation between the seasonal diet tannin concentration and the gastrointestinal nematode percentage of infection and intensity of egg-elimination was studied, lower prevalence and egg per gram values were detected in spring and autumn, coinciding with the periods when roe deer feed themselves on vegetables with higher tannins levels. These results show that, in natural environments, gastrointestinal nematode burden could be modified by factors not well known yet, as the presence of tannins in food.

Keywords: roe deer, Galicia, gastrointestinal nematode, tannins, food.

ESPECIES DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES COMPARTIDAS POR CORZOS (*Capreolus capreolus*) Y GANADO VACUNO EN PASTOREO EN GALICIA

Pato, F.J.¹, Vázquez, L.¹, Panceira, A.¹, Díaz, P.¹, Uriarte, J.², Díez-Baños, N.³, Dacal, V.¹, López, C.¹, Panadero, R.¹, Díez-Baños, P.¹, y Morrondo, P.¹

¹Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Dpto. Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.

franciscoj.pato@rai.usc.es. ²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. 50059 Zaragoza. ³Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. 24071 León.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la Política Agraria Común ha supuesto un profundo cambio en las explotaciones ganaderas europeas, y en especial en las de ganado vacuno en España. Un importante número de explotaciones de vacuno lechero han desaparecido en los últimos años y se ha incrementado la superficie de terrenos dedicados a la explotación en extensivo de diferentes razas de vacuno. En Galicia los cambios en las explotaciones agrícolas y ganaderas han supuesto la reducción de la superficie cultivada, lo que conlleva el incremento de las zonas forestales que constituyen un hábitat ideal para el corzo por lo que este se ha expandido mucho en las 2 últimas décadas.

En la actualidad, en nuestra Comunidad el corzo y los rumiantes domésticos explotados en semiextensivo pueden compartir pastos lo que favorece el intercambio de infecciones parasitarias. Por ello, se sospecha que el corzo puede actuar como reservorio de infecciones para los rumiantes domésticos. En consecuencia, el conocimiento de las especies de parásitos que comparten estos rumiantes contribuirá a adoptar medidas más adecuadas de manejo y control de las infecciones parasitarias.

En este estudio nos proponemos determinar los niveles de parasitación presentes y también si los corzos y el ganado vacuno explotado en régimen semiextensivo comparten alguna especie de nematodos gastrointestinales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de heces de 1158 vacas Rubia Gallega y de 367 corzos. Se utilizó la técnica de flotación para detectar la presencia de huevos de nematodos gastrointestinales y los resultados se expresan como el número de huevos por gramo de heces (hpg).

Se realizaron los correspondientes coprocultivos para identificar los géneros de tricostrongídeos en las muestras fecales de las vacas, mientras que en los corzos, la identificación se hizo directamente sobre los adultos recogidos en el aparato digestivo de un total de 125 animales. Para determinar la carga parasitaria en abomaso, intestino delgado, ciego e intestino grueso, se procedió a su apertura longitudinal, se recogió el contenido intestinal y el líquido resultante se filtró a través de dos tamices de 400 y 150 μm . Con estereomicroscopio se extrajeron los adultos con una aguja entomológica, se contaron y se identificaron siguiendo las claves de Durette-Desset (1983) y Gibbons et al. (1982).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 67% de los corzos y el 59% de las vacas eliminaron huevos de estrongídeos y de *Nematodirus* spp, *Trichuris* spp y *Capillaria* spp. La mayor prevalencia (%) e intensidad de infección ($\bar{x}\pm\text{DE}$) correspondió a los estrongídeos (59%, 33 ± 24 en vacas y 64,4%, 130 ± 114 en corzos), seguida de las infecciones por *Nematodirus* spp (0,2%, $8\pm 0,13$; 2,8%, 70 ± 48), *Trichuris* spp (0,2%, 8 ± 0 ; 3,7%, 50 ± 0) y *Capillaria* spp (2%, 10 ± 5 ; 4,8%, 68 ± 30). En el ganado vacuno las especies más prevalentes fueron *Ostertagia* spp (47,5%) y *Cooperia* spp (25,4%) y en menor proporción se hallaron *Oesophagostomum* spp (12,5%), *Trichostrongylus* spp (11,5%) y *Chabertia* spp (1,3%).

En todos los corzos se hallaron adultos de nematodos gastrointestinales, con grandes oscilaciones en las cargas pues el número de adultos por animal osciló entre 32 y 6855 (\bar{x} = 1104). El órgano más parasitado fue el abomaso (100% de los corzos y \bar{x} = 1104 nematodos), seguido del intestino delgado (81%, \bar{x} = 98), intestino grueso (59%, \bar{x} = 2) y ciego (56%, \bar{x} = 2). Estos resultados coinciden con los hallados en estudios previos realizados en Galicia (100% de corzos infectados) por Díez et al. (1990) y Díez-Baños et al. (1995) aunque estos autores observaron prevalencias de infección del intestino delgado más elevadas (100%). Además, la prevalencia de infección por adultos de nematodos gastrointestinales en los corzos fue inferior a la observada por Nogareda et al. (2006) en ganado vacuno explotado en extensivo en Galicia (96,4%) y a la señalada por Valle Suárez et al. (1978) en vacas de la provincia de León (50%).

En los corzos se identificaron 18 especies de nematodos gastrointestinales (Tabla 1), siendo las más frecuentes *O. leptospicularis*, *S. spiculoptera* y *O. kolchida*. La mayoría de las especies se localizaron en abomaso e intestino delgado.

Tabla 1. Especies de nematodos gastrointestinales detectadas en corzos y en ganado vacuno de Galicia por García (1992) y Nogareda et al. (2006) y su localización.

	CORZOS	García (1992)	Nogareda et al. (2006)	Localización
<i>Ostertagia leptospicularis</i>	95,2%	-	-	A+ID
<i>Spiculoptera spiculoptera</i>	93,6%	-	-	A+ID
<i>Ostertagia kolchida</i>	88,8%	-	-	A+ID
<i>Nematodirus fillicollis</i>	65,6%	-	-	A+ID
<i>Spiculoptera mathevossiani</i>	62,4%	-	-	A+ID
<i>Oesophagostomum venulosum</i>	48,8%	-	-	C+IG
<i>Trichuris capreoli</i>	47,2%	-	-	C+IG
<i>Trichostrongylus axei</i>	25,6%	34,2%	-	A+ID
<i>Ostertagia circumcincta</i>	8,0%	0,9%	-	A
<i>Trichuris ovis</i>	4,8%	-	-	C+IG
<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	4,0%	-	-	A+ID
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	4,0%	-	-	A+ID
<i>Trichostrongylus capricola</i>	4,0%	-	-	A+ID
<i>Nematodirus spathiger</i>	3,2%	-	-	ID
<i>Chabertia ovina</i>	3,2%	-	-	IG
<i>Ostertagia trifurcata</i>	0,8%	-	-	A
<i>Cooperia pectinata</i>	0,8%	-	-	ID
<i>Cooperia punctata</i>	0,8%	6,1%	0,2%	ID
<i>Nematodirus helvetianus</i>	-	0,9%	-	ID
<i>Ostertagia ostertagi</i>	-	89,5%	98,5%	A
<i>Ostertagia lyrata</i>	-	24,6%	1,5%	A
<i>Cooperia oncophora</i>	-	4,4%	97,9%	ID
<i>Cooperia macmasteri</i>	-	1,8%	1,9%	ID
<i>Haemonchus contortus</i>	-	7,9%	-	A

A: abomaso; ID: intestino delgado; C: ciego; IG: intestino grueso

Estos resultados son similares a los señalados por Díez-Baños *et al.* (1995) pero difieren de los observados por Díez *et al.* (1990) quienes habían detectado infecciones por *Haemonchus* en el abomaso.

Como se puede observar en la Tabla 1, en la que se comparan las especies de nematodos halladas en los corzos y las citadas por otros autores (García, 1992 y Nogareda *et al.*, 2006) en ganado vacuno explotado en régimen semiextensivo en Galicia, se comprueba que ambos rumiantes se encuentran infectados con *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei* y *Cooperia punctata*. Aunque es necesario seguir profundizando en este tema, se puede concluir que los corzos y el ganado vacuno de Galicia comparten especies de nematodos gastrointestinales, y por ello el corzo puede actuar como reservorio de estas infecciones para el ganado vacuno, por lo que habrá que tener en cuenta las consecuencias epidemiológicas que se derivan de estos hechos para lograr un mejor control de estas y otras importantes infecciones parasitarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Díez, N., Díez, P., Morrondo, M.P. 1990. VII Congrès International de Parasitologie, Bulletin de la Société Française de Parasitologie. París, Francia. • Díez-Baños, N., Carrillo-González, E., López-Almarza, J., Morrondo-Pelayo, P., Díez-Baños, P. 1995. Seventh International Helminthological Symposium. Košice, Slovak Republic. • Durette-Desset, M.C. 1983. CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates No. 10., Farnham Royal, Bucks, England. Commonwealth Agricultural Bureaux, 85 pp. • García, C. 1992. Tesis Doctoral, Universidad de León. • Gibbons, L.M., Khalil, L.F. 1982. J. Helminthol. 56:185-233. • Nogareda, C., Mezo, M., Uriarte, J., Lloveras, J., Cordero del Campillo, M. 2006. J Vet Med. 53:439-444. • Valle-Suárez, J.M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Díez-Baños, P. 1978. Hygia Pecoris, 1:82-107.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el Proyecto de Investigación FAU2006-00006-00-00 (I.N.I.A.) y por el proyecto de investigación 07MRU034261PR (Xunta de Galicia). Queremos manifestar nuestro agradecimiento a todos los cazadores gallegos que nos han facilitado la recogida de muestras.

GASTROINTESTINAL NEMATODE SPECIES SHARED BY ROE DEER (*Capreolus capreolus*) AND GRAZING CATTLE FROM GALICIA

ABSTRACT: Prevalence and intensity of infection by gastrointestinal nematodes in roe deer and grazing cattle from Galicia were studied. The possibility that these ruminants could share some gastrointestinal nematode species was also evaluated. A high percentage of roe deer (67%) and cattle (59%) shed gastrointestinal nematode eggs. Several trichostrongylide-genera eggs, just as *Nematodirus* spp, *Trichuris* spp and *Capillaria* spp eggs were found in the faeces of both ruminants. The most prevalent genera in cattle were *Ostertagia* spp (47.5%) and *Cooperia* spp (25.4%) whereas the percentages of infection by *Oesophagostomum* spp (12.5%), *Trichostrongylus* spp (11.5%) and *Chabertia* spp (1.3 %) were lower. In roe deer, the most frequent species were *Ostertagia leptospicularis* (95%), *Spiculopteria spiculoptera* (94%) and *Ostertagia kolchida* (89%).

When gastrointestinal nematode species found in roe deer were compared with those identified in cattle from Galicia by other authors, it was observed that both ruminants were infected with *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei* and *Cooperia punctata*.

These results showed that mixed infections by these nematodes may occur between roe deer and cattle when both ruminants graze in common areas.

Keywords: roe deer, cattle, Galicia, gastrointestinal nematodes.

INFECCIONES POR COCCIDIOS EIMÉRIDOS QUE AFECTAN A CORZOS Y A GANADO VACUNO EN EXTENSIVO EN GALICIA

Díaz, P., Dacal, V., Vázquez, L., Pato, J., Paz, A., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., Francisco, I., Cienfuegos, S., Díez-Baños, P. y Morrondo, P.
Parasitología y Enfermedades parasitarias, Dpto. de Patología Animal, Facultade de Veterinaria. Universidade de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.
e-mail: pablo.diaz@usc.es

INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades parasitarias más importantes de los rumiantes, tanto domésticos como silvestres, se encuentran las coccidiosis, causadas principalmente por protozoos del género *Eimeria*. Las coccidiosis ocasionan importantes pérdidas económicas en los animales de renta al provocar la aparición de diarreas profusas, acompañadas habitualmente de deshidratación, inapetencia y pérdida de apetito y de peso, aunque la gravedad del cuadro clínico depende principalmente de la carga parasitaria y de la patogenicidad de la especie implicada. Diversos estudios realizados en nuestro país han puesto de manifiesto elevadas prevalencias de infección por coccidios eiméridos en rumiantes domésticos (Cornejo et al., 1986; Ramajo-Martín et al., 1995; Paz-Silva et al., 1998), sobre todo en animales muy jóvenes o explotados en régimen intensivo. Sin embargo, los trabajos sobre coccidiosis en rumiantes domésticos en extensivo y silvestres o en animales adultos son escasos. Por todo ello, y con objeto de conocer la prevalencia de infección por las diferentes especies de *Eimeria* y la intensidad de eliminación de ooquistes en rumiantes silvestres y domésticos mantenidos en extensivo de Galicia, se tomaron muestras de heces de bóvidos de raza Rubia Gallega y de corzos procedentes de la provincia de Lugo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo entre los años 2007 y 2008 y en él se analizaron 904 y 367 muestras de heces de vacas de raza Rubia Gallega y de corzo, respectivamente, pertenecientes a la provincia de Lugo. La Rubia Gallega es una raza autóctona de ganado vacuno de triple aptitud que se explota fundamentalmente en régimen de pastoreo extensivo, ya que el clima de Galicia, caracterizado por temperaturas suaves y precipitaciones abundantes, permite que los animales salgan al pasto diariamente. Debido a su rusticidad, esta raza suele emplearse para el aprovechamiento de pastos de montaña o de difícil acceso a maquinaria agrícola, donde pueden coincidir con rumiantes silvestres, como el corzo, muy abundantes en la zona.

Para el estudio de la influencia de la edad sobre la prevalencia y la intensidad de eliminación, los animales se dividieron en tres grupos: jóvenes (menores de 2 años), adultos (de 2 a 5 años) y viejos (mayores de 5 años). La información acerca de la edad de los bóvidos fue suministrada por el propietario en el momento del muestreo; la de los corzos se estimó mediante el estudio de la erupción de las diferentes piezas dentales.

Las muestras se analizaron mediante la técnica coprológica de flotación y los resultados se presentaron como el número de ooquistes por gramo de heces (opg). Con objeto de esporular los ooquistes de *Eimeria* presentes, las heces se incubaron en dicromato potásico al 2,5% durante 15 días a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo descrito por Hendrix (1999). La identificación específica se realizó mediante el estudio morfométrico de los ooquistes esporulados empleando las claves realizadas por Pellérdy (1974) y MAFF (1986). Los resultados se procesaron con Open Office 2.4. Como medida de tendencia central se empleó la media (\bar{x}), y se utilizó la desviación estándar (D.E.) como medida de dispersión. El análisis estadístico se realizó con SPSS (v.16.0), empleando las pruebas Chi-cuadrado, ANOVA y Bonferroni post-hoc.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de bóvidos y de corzos que eliminaban ooquistes de coccidios fue elevado (32% y 42%, respectivamente), coincidiendo con varios estudios realizados en ganado vacuno de la misma zona de estudio (Paz-Silva et al., 1998; Morrondo et al., 2003). Sin embargo, Ramajo-Martín et al. (2005) en un trabajo sobre diferentes especies de rumiantes silvestres en Salamanca, no encontraron corzos infectados con *Eimeria* spp; en muflón, cabra montés y ciervo las prevalencias fueron elevadas. La excreción media de ooquistes por gramo de heces en los bovinos fue reducida (42 ± 87 opg) y similar a la observada en otros estudios realizados en vacuno de Galicia (Morrondo et al., 2003; Díaz et al., 2005), mientras que en los corzos el recuento medio de ooquistes por gramo fue netamente superior (491 ± 641 opg). Estas eliminaciones suponen una elevada contaminación del medio, favoreciendo la difusión de la enfermedad, sobre todo a los animales más jóvenes.

Las especies de coccidios identificadas en ganado vacuno fueron, de mayor a menor prevalencia, *E. bovis* (100%), *E. ellipsoidalis* (100%), *E. wyomingensis* (85%) *E. zuernii* (43%) y en menor proporción, se hallaron *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. cylindrica* y *E. subspherica*. Estos porcentajes fueron superiores a los observados en otros estudios realizados en Europa, donde además se detectaron *E. canadensis*, *E. brasiliensis*, *E. bukidnonensis* y *E. illinoisensis* (Cicek et al., 2007; Stewart et al., 2008). Las diferentes especies de *Eimeria* identificadas en las muestras de los corzos fueron *E. patavina* (98%), *E. capreoli* (77%), *E. cutebrina* (55%), *E. superba* (25%), *E. panda* (20%), *E. rotunda* (14%) y *E. ponderosa* (7%). Estos resultados difieren a los hallados por Dyk y Chroust (1974) y Vetyška (1980) en corzos de la antigua Checoslovaquia, y por Pilarczyk et al. (2005) en Polonia, donde no encontraron ooquistes de *E. patavina* y *E. cutebrina*.

Al relacionar la prevalencia y la intensidad de excreción de ooquistes con la edad de los animales, los valores más elevados se obtuvieron en el grupo de jóvenes. En bovinos, se observó un descenso en el porcentaje de infección y en el número de opg a medida que aumentaba la edad (Tabla 1), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2 = 54,248$; $P = 0,001$; $F = 22,225$; $P < 0,001$). Con Bonferroni se comprobó que las diferencias fueron significativas entre jóvenes y adultos ($P < 0,001$) y entre jóvenes y viejos ($P < 0,001$). Nuestros resultados coinciden con los señalados por Fayer et al. (2000) y Faber et al. (2002). En corzos, los valores de prevalencia y de intensidad de eliminación de opg fueron notablemente más reducidos en los animales adultos que en los jóvenes, mientras que se observó un ligero incremento en los animales más viejos (Tabla 1). Sólo las diferencias detectadas en la excreción de opg fueron estadísticamente significativas ($F = 7,595$; $P = 0,001$), encontrándose, al igual que en vacuno, entre jóvenes y adultos ($P < 0,001$) y entre jóvenes y viejos ($P < 0,05$). Dausgschies y Najdrowski (2005) señalaron que la correlación inversa entre la edad de los animales y el porcentaje de infección e intensidad de eliminación es indicativa de que los animales son capaces de controlar el nivel de las infecciones o posteriores reinfecciones gracias a una respuesta inmunitaria específica protectora de tipo celular que se mantiene solo por la exposición continuada de los animales. Sin embargo, el aumento de los valores de prevalencia y eliminación de opg en los corzos de mayor edad parecen indicar que el grado de protección generado por la respuesta inmunitaria en esta especie no es tan completo como el alcanzado en vacuno, aunque son necesarios más estudios para llegar a establecer las causas de este incremento.

Los resultados de este estudio muestran la importancia de esta parasitosis tanto en ganado vacuno mantenido en régimen extensivo como en rumiantes silvestres, pudiendo ocasionar importantes pérdidas de condición corporal en ambos hospedadores, así como influir en la calidad del trofeo en el caso de los corzos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cicek, H., Sevimli, F., Kozan, E., Köse, M., Eser, M. & Doğan, N. 2007. *Parasitol Res.* 101: 1239-43.
- Cornejo, S., Suárez, L., Álvarez, F., Alunda, J.M. & Rojo, F.A. 1986. *ONE Veterinaria* 62: 22-46.
- Dausgschies, A. & Najdrowski, M. 2005. *J. Vet. Med. B.* 52: 417-427.

- Díaz, P., Pedreira, J., Arias, M., Lomba, C., Suárez, J.L., Paz, A. & Morrondo, P. 2005. *Buiatría Española* 10: 231-234.
- Dyk, V. & Chroust, K. 1974. *Acta Vet. Brno.* 43: 65-77.
- Faber, J.E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Burger, H.J. & Zahner, H. 2002. *Vet. Parasitol.* 104: 1-17.
- Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.K. & Lewis, E.J. 2000. *Vet. Parasitol.* 93: 103-112.
- Hendrix, C.M., 1999. Hartcourt Brace de España, S.A., Barcelona, España. 265-266.
- MAFF, (1986). *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin* Nº18, London, HMSO, 2-67.
- Morrondo, P., Díaz, P., Pedreira, J., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Arias, M. & Díez-Baños, P. 2003. *XI Congreso Internazionale della Fe.Me.S.P.Rum.* Olbia.
- Paz, A., Panadero, R., Sánchez-Andrade, R., López, C., Díez-Baños, P. & Morrondo, P. 1998. *Consulta de Difusión Veterinaria* 54: 113-115.
- Pellérdy, L. P. 1974. *Akademia, Kido*, Budapest.
- Pilarczyk, B., Balicka-Ramisz, A., Ramisz, A. & Lachowska, S. 2005. *Wiad Parazytol.* 51: 307-10.
- Ramajo-Martín, V., López-Aban, J., Serrano, A.E., Oleaga-Pérez, A. & Muro, A. 1995. *Res. Rev. Parasitol.* 55: 231-234.
- Ramajo-Martín, V., Ramajo-Hernández, A., Oleaga, A. & Pérez-Sánchez, R. 2005. *Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*.
- Větýška, V. 1980. *Acta Vet. Brno.* 49: 91-103.

Tabla 1. Porcentajes de infección y valores medios y máximos de opg al considerar la edad de los animales estudiados

		Prevalencia	$\bar{x} \pm D.E.$ (opg)	Máx(opg)
Vacuno	Joven	62%	85 \pm 156	1000
	Adulto	47%	34 \pm 48	256
	Viejo	23%	31 \pm 67	568
	Total	32%	42 \pm 87	1000
Corzo	Joven	58%	1004 \pm 1107	3600
	Adulto	37%	388 \pm 463	1700
	Viejo	52%	403 \pm 462	1600
	Total	42%	491 \pm 641	3600

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por los proyectos de investigación FAU2006-00006-00-00 (INIA, España), 07MRU034261PR (Xunta de Galicia, España) y PGIDIT04RAG261009PR (Xunta de Galicia, España) y por una beca predoctoral (Xunta de Galicia, España) a P. Díaz.

***Eimeria* INFECTIONS IN CATTLE MAINTAINED UNDER AN EXTENSIVE SYSTEM AND ROE DEER FROM GALICIA**

ABSTRACT: Coccidiosis causes significant economic losses in animals, mainly in young animals and in those maintained under an intensive breeding system. The main goal of this research was to determine the prevalence of coccidiosis and oocyst shedding in Rubia Gallega cattle breed reared in an extensive regime and in wild ruminants (roe deer) from Galicia.

Prevalences were high in both cattle (32%) and roe deer (42%), whereas oocyst-output was much lower in cattle (42 \pm 87 opg) than in roe deer (491 \pm 641 opg). The *Eimeria* species identified in cattle were *E. bovis* (100%), *E. elipsoidalis* (100%), *E. wyomingensis* (85%), *E. zuernii* (43%) and in a lesser percentage, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. cylindrica* and *E. subspherica*. In roe deer, *E. patavina* (98%), *E. capreoli* (77%), *E. cutebrina* (55%), *E. superba* (25%), *E. panda* (20%), *E. rotunda* (14%) and *E. ponderosa* (7%) were detected. When the influence of age on the percentages of infection and oocyst-output was studied a negative correlation was observed, and the youngest animals presented the highest values. Those results show that *Eimeria* is a widespread parasite in both roe deer and cattle maintained under an extensive breeding system, and it could be the cause of important economic losses in cattle, just as the decrease of the quality of the trophy in roe deer.

Keywords: *Eimeria*, coccidiosis, cattle, roe deer

PREVALENCIA DE *SALMONELLA* SPP EN CERDOS DE CEBO EN ARAGÓN

Vico, J.P. y Mainar-Jaime, R.C¹.

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón. Avda. de Montañana, 930. 50059 Zaragoza. Tfno.: 976716455. E-mail: rcmainar@aragon.es

INTRODUCCIÓN

En los países industrializados, la salmonelosis está considerada una de las infecciones con mayor prevalencia de entre las transmitidas al hombre por alimentos contaminados. Actualmente la carne de cerdo se considera la segunda fuente más importante de infección de salmonelosis humana (Steinbach y Hartung, 1999). En algunos países europeos el consumo de carne de cerdo contaminada supone del 10 al 23% de la incidencia total de salmonelosis humana (Hald y Wegener, 1999).

Los principales países productores de cerdo en Europa están desarrollando programas de vigilancia y control de *Salmonella* con el objetivo de incrementar la seguridad de la carne de cerdo y sus derivados (Nielsen et al., 2001; Sandberg et al., 2002). España está obligada a adoptar programas similares si quiere mantenerse competitiva tanto en el mercado nacional como internacional. De hecho, las autoridades sanitarias de la Unión Europea, a través de la Directiva 2003/99/CE del 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y del Reglamento (CE) N° 2160/2003 del 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos, establece la obligatoriedad de poner en marcha programas específicos para la detección y el control de *Salmonella*, mediante un control exhaustivo de todas las fases de la cadena alimentaria (“de la granja a la mesa”), contemplando medidas restrictivas para aquellas explotaciones que no consigan los objetivos deseados. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomendaba a los países miembros de la UE iniciar estudios que ayuden a determinar la situación de la salmonelosis porcina (Anónimo, 2008a).

El primer paso para establecer un programa de control de la salmonelosis porcina es conocer la situación epidemiológica de esta infección. El presente trabajo estudia la prevalencia de salmonelosis en cerdos cebados y sacrificados dentro del territorio de la comunidad autónoma aragonesa.

MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo se realizó a partir de 6 mataderos de la Comunidad Autónoma de Aragón (1 en la provincia de Huesca, 3 en Teruel y 2 en Zaragoza). Estos 6 mataderos representaban aproximadamente el 75% de los sacrificios de cerdos de cebo en Aragón.

A la llegada al matadero se seleccionaban aleatoriamente de la cadena de faenado 25 animales de una explotación. Del paquete intestinal de cada animal se recogían un mínimo de 25 gramos de ganglios mesentéricos. El procedimiento seguido para el cultivo bacteriológico fue el descrito en el anexo D de la norma ISO 6579 para la detección de *Salmonella* spp (ISO, 2002).

Los aislados confirmados como *Salmonella* spp, se enviaban al Centro Nacional para Salmonelosis Animal (Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Madrid) para su serotipado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Entre Febrero de 2008 y Febrero de 2009 se muestrearon un total de 998 animales pertenecientes a 40 explotaciones (9 de la provincia de Huesca, 17 de Teruel y 14 de Zaragoza). En el 29% (290) de los animales se aisló *Salmonella* spp. El 92,5% (37) de los cebaderos estudiados presentaron al menos un animal positivo a *Salmonella* spp. en ganglios mesentéricos. El rango de prevalencia entre las explotaciones positivas fue del 4% al 76%. La distribución de la prevalencia por categorías se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de la prevalencia a *Salmonella* spp en explotaciones de porcino de cebo de Aragón.

Prevalencia	Huesca (%)	Teruel (%)	Zaragoza (%)	TOTAL
0%	0 (0)	3 (17,6)	0 (0)	3 (7,5)
≤10%	1 (11,1)	0 (0)	5 (35,7)	6 (15)
>10% y ≤20%	2 (22,2)	4 (23,5)	2 (14,3)	8 (20)
>20% y ≤40%	2 (22,2)	7 (41,2)	2 (14,3)	11 (27,5)
>40%	4 (44,4)	3 (17,6)	5 (35,7)	12 (30)

Hasta la fecha se han serotipado 275 aislados de *Salmonella*. Los serotipos más frecuentemente observados se presentan en la Tabla 2. De las 33 explotaciones de las que se tienen los resultados completos de serotipado en 19 (58%) se aisló el serotipo Typhimurium. De aquellas explotaciones en que se detectó más de un animal infectado (un total de 30), en 12 (40%) se aislaron 3 o más serotipos distintos, en 11 (37%) se aislaron dos serotipos y en 7 un sólo serotipo.

Tabla 2. Distribución de los principales serotipos de *Salmonella* observados en un estudio de prevalencia de salmonelosis porcina en Aragón.

Serotipo	Número	%
Typhimurium	94	34,2
Rissen	28	10,1
4,12:i:-	18	6,5
Wien	13	4,7
Anatum	11	4
Enteritidis	9	3,3
London	9	3,3
Kapemba	8	2,9
Szentes	8	2,9
Habana	5	1,8
Mikawasima	5	1,8
Newport	5	1,8
4,5,12:i:-	5	1,8
Otros	57	21

A pesar de que la selección de los animales en este estudio ha sido diferente a la realizada en el reciente estudio de la EFSA para estimar la prevalencia de *Salmonella* spp en cerdos de cebo en España (Anónimo, 2008b), nuestros resultados coinciden con los publicados por esta agencia. La prevalencia de salmonelosis porcina en Aragón podría considerarse por lo tanto similar a la observada en España (29%) y muy superior a la media europea (10%).

Sin embargo, a nivel de explotación los resultados discrepan con los realizados en otros estudios nacionales. García-Feliz et al. (2007) aislaron *Salmonella* spp en menos del 50% de los cebaderos de Aragón estudiados. Otro estudio (Mejía, 2003) encontró que sólo el 20% de los cebaderos eran positivos a *Salmonella* spp en Cataluña. En ambos estudios se utilizó como muestra heces recogidas directamente de las explotaciones y en un número inferior al utilizado en nuestro estudio lo que probablemente disminuyó la sensibilidad para detectar explotaciones positivas. La utilización de ganglios linfáticos además de indicar la infección de un animal resulta de mayor sensibilidad que la utilización de materia fecal.

Los serotipos observados también coinciden en gran medida con los observados en el estudio de la EFSA y los otros dos estudios en España. El serotipo Typhimurium, de gran importancia zoonótica, fue el más aislado en la mayoría de los estudios, seguido por Rissen, Wien y Anatum. También se observa con gran frecuencia la variedad monofásica 4,[5],12:i:- que sería una variante del serotipo Typhimurium y que presentaría también una clara

importancia zoonótica (Zamperini et al., 2007). A diferencia de estos estudios previos, sólo el serotipo Derby no apareció entre los principales serotipos observados.

En general de estos resultados se deduce que 1) la infección por *Salmonella* spp está ampliamente extendida en los cebaderos porcinos de Aragón; 2) que un gran porcentaje de los aislados de *Salmonella* corresponden a aquellos de mayor carácter zoonótico; y 3) que será necesario un gran esfuerzo por parte de los productores de porcino para reducir la prevalencia a al menos los niveles medios europeos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Anónimo. 2008a. *The EFSA J.* 206: 1-111. ● Anónimo. 2008b. *The EFSA J.* 135: 1-111. ● García-Feliz, C., Collazos, J.A., et al. 2007. *Zoon. Public. Health.* 54: 294-300. ● Hald, T. & Wegener, H.C. 1999. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork.* Washington DC: 200-205. ● ISO, International Organisation for Standardisation. 2002. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples from the primary production stage. Génova, Suiza. ● Mejía, W. 2003. Tesis Doctoral. UAB. ● Nielsen, B., Alban, L., Stege, H., et al. 2001. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 114: 323-6. ● Sandberg, M., Hopp, P., Jarp, J., et al. 2002. *Int J Food Microbiol.*, 72: 1-11. ● Steinbach, G. & Hartung, M. 1999. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 112: 296-300. ● Zamperini, K., Soni, V., et al. 2007. *Avian Dis.* 51: 958-64.

Agradecimientos: Agradecemos a Ana Clara Montolio García todo el trabajo laboratorial desarrollado. Este estudio está financiado por el proyecto MEC-INIA RTA2007-65.

Salmonella PREVALENCE IN FINISHING PIGS IN ARAGON

ABSTRACT: a cross sectional study shows that prevalence of *Salmonella* infection in finishing pigs in Aragón is 29%. Major serotypes were Typhimurium, Rissen, 4,[5],12:i:-, Wien and Anatum. Important efforts will be required to decrease the prevalence to European levels.

Keywords: salmonella, prevalence, swine, Aragón

CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA SALMONELOSIS PORCINA EN CERDOS SACRIFICADOS EN ARAGÓN

Vico, J.P. y Mainar-Jaime, R.C¹.

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón. Avda. de Montañana, 930. 50059 Zaragoza. Tfno: 976716455. E-mail: rcmainar@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La Unión Europea (UE) pretende iniciar programas de control de salmonelosis porcina a principios de 2011. Los objetivos de estos programas deberán quedar definidos tras la evaluación de la situación epidemiológica en cada estado miembro. España presenta la mayor prevalencia de salmonelosis porcina en animales de cebo de la UE (Anónimo, 2008). Aragón presentaría niveles de prevalencia similares a los descritos para todo el país (Vico y Mainar-Jaime, 2009).

Los programas de control se sostienen sobre tres pilares básicos: 1) pruebas de diagnóstico con suficiente sensibilidad y especificidad; 2) información sobre la prevalencia de infección que sirva para determinar la necesidad de implementación de programas de control o la eficacia de los programas ya iniciados; y 3) conocimiento de los principales factores que favorecen el mantenimiento y dispersión de la infección para definir las actuaciones más adecuadas. En este trabajo estudiamos algunos factores que podrían estar asociados con la infección por *Salmonella* spp. en cerdos sacrificados en Aragón.

MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo y el análisis microbiológico se han descrito en una comunicación anterior (Vico y Mainar-Jaime, 2009). De cada explotación muestreada se obtuvo información general a partir de los datos facilitados por el matadero y de los registros sobre explotaciones existentes en el laboratorio regional de diagnóstico veterinario. En la Tabla 1 se observan las variables de las que se obtuvo información para cada explotación.

La posible relación entre los factores estudiados y la prevalencia a *Salmonella* spp se estudió inicialmente mediante un análisis univariable de *Chi*-cuadrado. En el caso de variables cuantitativas éstas se categorizaron previamente según percentiles (25%, 50% y 75%). Las variables inicialmente asociadas con la infección fueron posteriormente analizadas mediante un análisis multivariable de regresión logística donde se consideró el posible efecto *rebaño* producido por la agrupación de los animales por cebaderos.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las variables inicialmente analizadas 6 resultaron significativamente asociadas ($P \leq 0,1$) con la infección por *Salmonella* spp en cerdos sacrificados en Aragón, a saber, época del año, provincia, tamaño del cebadero, tamaño del lote sacrificado, mezcla de animales de distintos lotes en el camión y tiempo estimado de transporte (Tabla 1). En el análisis multivariable posterior se mantuvieron asociadas con la prevalencia a *Salmonella* spp ($P \leq 0,1$) la época del año, la mezcla de animales de distintos orígenes en el camión y el tamaño del cebadero (Tabla 2). El número de animales positivos fue superior en verano y otoño comparado con invierno y primavera. El tamaño del cebadero se asoció inversamente con la prevalencia a *Salmonella* spp. Aunque en pocas ocasiones se mezclaron animales de diversos cebaderos en el mismo camión, cuando esto ocurrió el porcentaje de animales positivos se incrementó.

La estación del año jugaría un papel fundamental en la transmisión de las salmonelosis porcina. Los cerdos sacrificados en otoño pasan una gran parte del periodo de cebo en condiciones ambientales favorables para el mantenimiento de *Salmonella* en el medio ambiente existiendo una mayor probabilidad de difusión (Hald et al., 2003). El tamaño del cebadero también estaría relacionado con esta infección. Es probable que los cebaderos con mayor número de animales mantengan unas mejores condiciones higiénicas lo que

podría justificar su menor prevalencia. El conocimiento de las condiciones particulares de cada cebadero nos ayudará a entender esta asociación. La mezcla de animales siempre se ha considerado un factor de riesgo de las enfermedades de carácter contagioso, especialmente en situaciones de estrés. La observación de esta relación a pesar del escaso número de animales que se transportaron mezclados con animales de otros orígenes apoya los estudios experimentales que han observado infecciones que alcanzan ganglios mesentéricos en pocas horas cuando los animales están expuestos a ambientes contaminados (Boughton et al, 2007).

Tabla 1. Variables utilizadas para la caracterización epidemiológica de la salmonelosis porcina en animales sacrificados en mataderos de Aragón.

Variable	Total	% positivos	P
<i>Provincia</i>			
Huesca	349	35,6	0,051
Teruel	225	27,2	
Zaragoza	424	27,2	
<i>Época del año del sacrificio</i>			
Invierno	324	26,2	0,047
Primavera	251	25,1	
Verano	249	32,1	
Otoño	174	35,6	
<i>Tipo de explotación</i>			
Cebadero	797	28,1	0,19
Ciclo cerrado	201	32,8	
<i>Tamaño cebadero*</i>			
≤1000	176	31,2	0,078
>1000 y ≤2000	374	28,3	
>2000 y ≤3000	149	26,2	
>3000	199	20,1	
<i>Tamaño lote*</i>			
≤124 animales	251	36,6	<0,01
>124 y ≤170 animales	274	29,2	
>170 y ≤200 animales	249	30,5	
>200 animales	224	18,7	
<i>Mezcla de animales de distintos lotes (camión)</i>			
Sí	898	27,2	<0,01
No	100	46	
<i>Tiempo estimado de transporte (horas)</i>			
≤ 0,5 horas	449	34,5	<0,01
>0,5 y ≤1 horas	301	28,9	
> 1 horas	248	19,3	
<i>Tiempo de espera en matadero (horas)*</i>			
≤4,16 horas	248	27,8	0,38
>4,16 y ≤10,25 horas	250	26,8	
>10,25 y ≤15,25 horas	275	33,1	
>15,25 horas	225	28	
<i>Indemne de Aujeszky</i>			
Sí	399	28,3	0,44
No	549	30,6	
<i>Cerdos destinados a Denominación de Origen Teruel</i>			
Sí	723	28,6	0,63
No	275	30,2	

*Variable categorizada según percentiles (25, 50 y 75%)

Tabla 2. Análisis multivariable de regresión logística para la caracterización epidemiológica de la salmonelosis porcina en animales sacrificados en mataderos de Aragón.

Variable	OR	P	95% IC(OR)
<i>Provincia*</i>			
Zaragoza	1		
Huesca	0,78	0,67	0,26-2,38
Teruel	0,43	0,09	0,16-1,15
<i>Época del año del sacrificio</i>			
Invierno	1		
Primavera	1.19	0,72	0,43-3,24
Verano	2.21	0,13	0,79-6,18
Otoño	3.10	0,05	0,99-9,68
<i>Tamaño cebadero**</i>			
≤1000	1		
>1000 y ≤2000	0,46	0,17	0,15-1,41
>2000 y ≤3000	0,57	0,36	0,16-1,93
>3000	0,32	0,08	0,08-1,15
<i>Mezcla de animales de distintos lotes (camión)</i>			
No	1		
Sí	5,58	0,004	1,71-18,15

*Incluido como posible factor de confusión. **Variable categorizada según percentiles (25, 50 y 75%)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anónimo. 2008. *The EFSA J.* 135: 1-111.
- Hald, T., et al. 2003. *Epidemiol & Infect.* 131: 1187-1203.
- Vico, J.P. & Mainar-Jaime, R.C. 2009. ITEA (comunicación anterior).
- Boughton, C. et al. 2007. *Foodborne Pathog Dis.* 4: 33-40.

Agradecimientos: Agradecemos a Ana Clara Montolío García todo el trabajo laboratorial desarrollado. Este estudio está financiado por el proyecto MEC-INIA RTA2007-65.

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SWINE SALMONELLOSIS IN SLAUGHTERED PIGS IN ARAGON

ABSTRACT: Logistic regression was used to determine major factors associated with *Salmonella* spp infection in slaughtered pigs. Time of the year, size of fattening units and mixing animals from different farms on the transport vehicle to the slaughterhouse were significantly associated with the infection.

Keywords: salmonella, risk factors, swine, Aragón

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ENTEROPATÍA EPIZOÓTICA DEL CONEJO SOBRE LOS RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS EN DOS CEBOS CONSECUTIVOS

Romero C.¹, Nicodemus N.¹, Chamorro S.¹, García-Ruiz A.I.², Ibañez M.A.³ y De Blas C.¹

¹ Dpto. de Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. ²

Nutreco Poultry and Rabbit Research Centre. 45950, Casarrubios del Monte, Toledo. ³ Dpto. de Estadística y Métodos de Gestión en Agricultura. E.T.S.I. Agrónomos. 28040.

correo electrónico: carlos.romerom@upm.es

INTRODUCCIÓN

Desde que apareciera en 1997 en las explotaciones cunícolas europeas, la Enteropatía Epizootica del Conejo (EEC) ha supuesto graves pérdidas económicas para este sector ganadero derivadas de unos altísimos niveles de mortalidad que han alcanzado e incluso sobrepasado el 60 % de los animales en cebo (Licois et al., 2006). No obstante, las altas tasas de mortalidad no son el único daño causado por esta enfermedad. Así, los descensos bruscos de consumo asociados a la EEC conllevan retrasos en el crecimiento y alargamientos, de hasta 14 días, del engorde en el caso de los animales enfermos que finalmente no mueren (Carabaño et al., 2005). Aunque a fecha de hoy, aún se desconoce la etiología de la EEC, ciertos trabajos (Le Normand et al., 2003, Romero et al., 2007) han señalado a la bacteria Gram(+) *Clostridium perfringens* como microorganismo patógeno implicado en el desarrollo de la EEC. Romero et al. (2008) propusieron el análisis de *C. perfringens* en cecótrofos como indicador indirecto de su concentración en el contenido digestivo. Por todo ello, este trabajo pretende mostrar la relación existente entre los conteos de *C. perfringens* en cecótrofos de gazapos en crecimiento con el peso, la mortalidad y la aparición de síntomas de la EEC, a lo largo de dos cebos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo, se utilizaron dos cebos consecutivos de gazapos de cruce Neocelandés Blanco x Californiano que se desarrollaron en la misma nave en las instalaciones de la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid. En ambos cebos, se utilizaron pienso (33,0 % FND, 15,5 % PB, 10,1 MJ ED/kg) y agua no medicados suministrados ad libitum. Los animales fueron alojados de 2 en 2 en jaulas de 600 x 250 x 330 mm³, con un programa de luz-oscuridad de 12 horas y de acuerdo al R.D. 1201/2005 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. En el primer cebo, se utilizaron 50 camadas (471 conejos) de las cuales 21 (209 conejos) fueron destetadas a los 35 días post-parto y las otras 29 camadas (262 conejos) a los 42 días post-parto. En el primer destete se seleccionaron al azar 8 camadas de las cuales se eligieron 3 conejos. Estos 24 gazapos (peso_{destete} = 752 g) fueron pesados a los 39, 46, 54 y 60 días de edad. A estos mismos conejos y a las mismas edades, se les puso un collar transparente (330 mm de diámetro y 33 g de peso) de 8 a 12 a.m. para la recogida de cecótrofos; la cual se llevó a cabo en jaulas individuales provistas con una bandeja para la recogida de heces. En el segundo destete se seleccionaron al azar 27 gazapos (3 gazapos/camada en 9 camadas; peso_{destete} = 1072 g) cuyos cecótrofos fueron recogidos a los 46, 53, 61 y 67 días de edad, días en los que también fueron pesados. En el siguiente cebo, se usaron 69 camadas (655 gazapos en total) que fueron destetadas a los 27 días post-parto. De estas camadas, se seleccionaron 6 que contaban con 8 gazapos. Estos 48 gazapos (peso_{destete} = 500 g) fueron pesados y se recogieron sus cecótrofos a los 30, 33, 37, 40 y 44 días de edad. Las restantes camadas de ambos periodos siguieron un cebo en condiciones productivas normales. En ambos cebos, la mortalidad se controló diariamente y se anotó la presencia de síntomas característicos de la EEC en aquellos animales que fueron pesados. Las muestras de cecótrofos fueron analizadas el mismo día de su recogida para el recuento en placas de colonias de *C. perfringens* según la norma ISO 7937 (1997).

El análisis estadístico de los conteos de *C. perfringens* en los cecótrofos ha sido realizado utilizando una regresión binomial negativa con el procedimiento GENMOD de SAS (1991). El peso de los gazapos a las distintas edades se ha analizado utilizando un modelo lineal mixto, asumiendo que los coeficientes de regresión de los días son aleatorios, con el procedimiento MIXED de SAS (1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer cebo, el 9 % de los animales usados para la recogida de cecótrofos presentó síntomas. En el segundo cebo, este mismo porcentaje ascendió a un 19 %. Estos porcentajes concuerdan con las tasas de mortalidad debidas a la EEC que fueron, respectivamente, de 2,97 y 12,2 % en cada uno de los cebos. En ambos casos, el porcentaje de morbilidad fue superior al de mortalidad. Esta observación confirma que hay animales que, sin ser tratados con antibióticos, logran sobrevivir y llegar al final del cebo. Así mismo, existió una diferencia entre los dos cebos en cuanto al conteo medio de *C. perfringens* medido en los cecótrofos, siendo éste mayor en el segundo cebo (75,13 vs 1518 x 10³ UFC/g).

En el primer cebo, la evolución de los conteos de *C. perfringens* de los cecótrofos fue distinta según la edad al destete, 35 ó 42 días de edad (Tabla 1; P_{días*destete} < 0,01).

Tabla 1. Evolución del conteo medio de *C. perfringens* en los cecótrofos en función de la edad al destete de los gazapos del primer cebo.

	Edad de los gazapos (días)			
Destete a 35 días	39	46	54	60
Conteo medio (UFC/g)	14743	16741	24669	47995
Destete a 42 días	46	53	61	67
Conteo medio (UFC/g)	191762	172364	74678	36352

Al comparar el conteo medio a 46 y 54 días de edad de los conejos destetados a 35 días con el conteo medio a 46 y 53 días de edad de los conejos destetados a 42 días, se observó que los conteos fueron significativamente más altos (P < 0,001) al destetar más tarde. Esto coincide con el número de bajas en cebo registrado en cada banda (2/209 = 0,96 % vs 12/262 = 4,58 %; P < 0,01) y con los resultados de otros autores (Garrido et al., 2006). Sin embargo, contrasta con lo observado por Romero et al. (2007). De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 1, se establecieron las siguientes ecuaciones:

Destete a 35 días:

$$CP_{\text{ceco}} (\ln \text{ UFC/g}) = 9,52 (\pm 0,53) + 0,0517 (\pm 0,046) * \text{Días transcurridos tras el destete}$$

$$\text{Destete a 42 días: } P < 0,001 \quad P < 0,01$$

$$CP_{\text{ceco}} (\ln \text{ UFC/g}) = 12,51 (\pm 0,42) - 0,084 (\pm 0,023) * \text{Días transcurridos tras el destete}$$

$$P < 0,001 \quad P < 0,001$$

Considerando conjuntamente las dos edades al destete del primer cebo, la evolución del conteo medio de *C. perfringens* medido en los cecótrofos fue similar en ambos periodos (Tabla 2).

Tabla 2. Evolución del conteo medio de *C. perfringens* según el número de días transcurridos tras el destete.

	Días transcurridos tras el destete				P _{días}	
Primer cebo	4	11	19	25		
Conteo medio (UFC/g)	112104 ^a	101626 ^a	50205 ^b	41644 ^b	< 0,001	
Segundo cebo	3	6	10	13	17	
Conteo medio (UFC/g)	105924 ^a	269446 ^b	3779833 ^c	3591047 ^c	216608 ^b	< 0,001

En los dos cebos, el conteo de *C. perfringens* aumentó de forma significativa en torno a los 10 días post-destete con independencia de la edad a la que fueron destetados los gazapos. Este hecho concuerda con el seguimiento de la mortalidad debida a la EEC puesto que en el primer cebo, el día medio de mortalidad fue (media \pm DS) 10,86 \pm 4,25 días tras el destete y en el segundo cebo, los conejos murieron de media a los 11,5 \pm 2,27 días post-destete.

El efecto de los conteos de *C. perfringens* sobre el peso de los gazapos se muestra a través de las siguientes ecuaciones de regresión. Las variables "días", "DCP" y "Síntomas" corresponden respectivamente al número de días que han transcurrido tras el destete, a la diferencia entre el conteo de un día y el conteo medio de todos los animales (en ln UFC/g) y a la ausencia o presencia de síntomas característicos de EEC.

Primer cebo (destete a 35 días):

$$\text{Peso (g)} = 972,14 + 52,46 \cdot \text{Días} - 30,01 \cdot \text{DCP}_{\text{ceco}} + 1,48 \cdot \text{Días} \cdot \text{DCP}_{\text{ceco}}$$

(\pm 59,38)	(\pm 1,47)	(\pm 12,25)	(\pm 0,83)
P<0,001	P<0,001	P<0,01	P<0,05

Segundo cebo:

$$\text{Peso (g)} = 615,7 + 42,8 \cdot \text{Días} - 0,60 \cdot \text{Días} \cdot \text{DCP}_{\text{ceco}} - 24,5 \cdot \text{Días} \cdot \text{Síntomas}$$

(\pm 29,25)	(\pm 1,87)	(\pm 0,19)	(\pm 2,55)
P<0,001	P<0,001	P<0,01	P<0,001

De forma global, de estas ecuaciones se deduce que la aparición de síntomas de EEC o un aumento del conteo de *C. perfringens* en los cecótrofos tienen un efecto negativo sobre el peso de los conejos cebados. Esto supone una pérdida económica importante para el ganadero puesto que el importe que recibe al final del cebo es función del total de kilos de peso vivo que suministra a los mataderos. Por otro lado, la heterogeneidad de pesos que el ganadero obtendría al final del cebo, asociada al número de animales mórvidos, representa otra pérdida económica reseñable dado que esos animales pueden no ser aceptados a la hora del sacrificio. Por tanto, el incremento de la mortalidad no es el único daño producido por la EEC (Lovland y Kaldhusdal, 2001; Licois, 2007).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Eureka E! 3854.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carabaño R., Rebollar P.G., Gómez-Conde M.S., Chamorro S., García J., De Blas C. 2005. FEDNA 113-129.
- Le Normand B., Le Guenec J., Moalic P.Y. 2003. *J. de la Rech. Cunicole* 239-241.
- Garrido S., Nicodemus N., Chamorro S. De Blas J.C. 2006. ASESU 95-101.
- Licois D., Coudert P., Marlier D. 2006. *Recent Adv. in Rabbit Sci.* 163-170.
- Licois D. 2007. *J. de la Rech. Cunicole* 217-220.
- Lovland A., Kaldhusdal M. 2001. *Avian Path.* 30: 73-81.
- Romero C., Nicodemus N., Corujo A., Astillero J.R., De Blas J.C. 2007. *J. de la Rech. Cunicole* 85-88.
- Romero C., Nicodemus N., Astillero J.R., García A.I., de Blas J.C. 2008. World Rabbit Congress 797-801.
- SAS 1991. SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.

ESTIMATION OF EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY EFFECT ON WEIGHT LOSS BY MEANS OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* CONCENTRATION IN SOFT FAECES

ABSTRACT: Currently, Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) is deemed the major disease affecting intensive European farm. The concentration of *Clostridium perfringens* in digestive contents of young rabbits has been shown to be highly correlated with average diarrhea mortality in the fattening period. Therefore, this work aims to evaluate the effect of ERE on production performance in young rabbits by means of *C. perfringens* enumeration in soft faeces. It has been observed that counts are significantly higher around ten days after weaning, irrespective of the age at which rabbits were weaned. Furthermore, this work shows that high counts of *C. perfringens* and the appearance of clinical signs of ERE reduced bodyweight at slaughter and led to a heterogeneity of weights due to the presence of morbid animals.

Keywords: Impaired productive traits, *Clostridium perfringens*, Epizootic Rabbit Enteropathy

EFFECTO DE LA CAMADA Y LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE LA MORTALIDAD DE GAZAPOS EN PERIODOS CON DISTINTA INCIDENCIA DE ENTEROPATÍA EPIZOÓTICA DEL CONEJO

Romero C.¹, Nicodemus N.¹, Chamorro S.¹, Corujo A.²,
Martínez-Morentin C.G.¹, Margüenda I.¹ y De Blas C.¹

¹ Dpto. de Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

² Nutreco Poultry and Rabbit Research Centre. 45950, Casarrubios del Monte, Toledo.

correo electrónico: carlos.romerom@upm.es

INTRODUCCIÓN

Pese a la escasez de trabajos que lo cuantifiquen, el efecto de la camada es uno de los efectos más significativos y repetibles en pruebas experimentales en cunicultura. En este sentido, García et al. (2001) señalaron, en base a una revisión de numerosos trabajos, que la variabilidad explicada por la camada oscilaba entre un 24,5 y un 62,6 % cuando las variables estudiadas eran de tipo productivo. Sin embargo, se desconoce la existencia de trabajos que cuantifiquen el efecto de la camada sobre la microflora cecal de los gazapos y sobre las tasas de mortalidad en cebo. Con el fin de reducir estas últimas, trabajos previos (Garrido et al., 2006 ; Romero et al., 2007) mostraron que, incidiendo en la limpieza y desinfección de las granjas, se pudo prevenir la mortalidad asociada a la Enteropatía Epizootica del Conejo (EEC). Para estimar la incidencia de esta enfermedad, Romero et al. (2007) propusieron a la bacteria Gram(+) *Clostridium perfringens* como un indicador bastante fiable, dada su alta correlación con los porcentajes de mortalidad ($r = + 0,96$; $P < 0,001$) y su elevada proliferación en los contenidos digestivos de los animales enfermos (Le Normand et al., 2003). Por tanto, este trabajo pretende evaluar el efecto de la camada y la higiene en una granja de cebo, a lo largo de dos bandas consecutivas, sobre la tasa de mortalidad debida a la EEC y sobre los conteos de *C. perfringens*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo, se utilizaron dos cebos consecutivos de gazapos de cruce Neocelandés Blanco x Californiano que se desarrollaron en la misma nave en las instalaciones de la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid. En ambos cebos, se utilizaron pienso (33,0 % FND, 15,5 % PB, 10,1 MJ ED/kg) y agua no medicados a los que los animales tuvieron libre acceso. Los animales fueron alojados de 2 en 2 en jaulas de 600 x 250 x 330 mm³, con un programa de luz-oscuridad de 12 horas y de acuerdo con el R.D. 1201/2005 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Antes del comienzo de cada cebo, las jaulas fueron lavadas con agua a presión y quemadas con un soplete. A continuación, se aplicó sobre las jaulas y el suelo un producto esporicida disuelto en agua (Composición: 15 % Glutaraldehído, 10 % Cloruro de didecildimetil-amonio, 10 % Cipermetrina). En el primer cebo, se utilizaron 50 camadas (471 conejos), de las cuales 21 (209 conejos) fueron destetadas a los 35 días post-parto y las otras 29 camadas (262 conejos) a los 42 días post-parto. En el segundo cebo, se usaron 69 camadas (655 gazapos) destetadas a los 27 días post-parto. En ambos cebos, los gazapos fueron alojados conservando la camada, de modo que nunca se mezclaron hermanos de distintas camadas en una misma jaula.

A lo largo de los dos cebos y hasta el final de los mismos (63 días de edad), se registró diariamente la mortalidad debida a la EEC, anotando la camada de origen de las bajas.

Para estimar la carga ambiental de la nave en esporas de *C. perfringens*, se tomaron muestras de polvo de los extractores de aire, al comenzar el cebo, pasados 15 días y al final del mismo. Así mismo, tras el destete del segundo cebo, se tomaron muestras del nido de 3 conejas cuyas camadas, en el cebo anterior, habían tenido muchas bajas y de otras 3 conejas cuyas camadas finalizaron el cebo sin mortalidad. Esas muestras también fueron analizadas para cuantificar el número de esporas de *C. perfringens*. Paralelamente, el día siguiente al destete del segundo cebo, esas 6 conejas fueron alojadas de forma individual en

jaulas provistas con bandejas y se les colocó un collar transparente de plástico (330 mm de diámetro y 33 g de peso) de 08:00 a 12:00 para poder recoger sus cecótrofos y analizar, en ellos, el contenido en células vegetativas de *C. perfringens*. Por último, se determinó también la concentración cecal en células vegetativas de *C. perfringens* en algunos animales enfermos de cada uno de los cebos. Para determinar la concentración de células vegetativas de *C. perfringens*, se hicieron conteos en placa de acuerdo con la norma ISO 7937, 1997. Para estimar el número de esporas en el polvo de los extractores o en los nidales, se siguió exactamente el mismo proceso (Norma ISO 7937, 1997), salvo que, en este caso, se calentó previamente la muestra a 75 °C durante 15 minutos.

El efecto de la camada sobre la mortalidad se estudió utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (1991) mientras que, para comparar la tasa de mortalidad entre los dos cebos, se usó el procedimiento CATMOD (SAS, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer ceco, el porcentaje de mortalidad debido a la EEC fue de 2,97 % mientras que en el segundo ceco la mortalidad ascendió a un 12,2 % ($P < 0,001$; Tabla 1). De las catorce bajas registradas en el primer ceco, doce pertenecían a tres camadas y en total todas las bajas procedían de cinco de las 50 camadas (sólo el 10 % de las camadas se vió afectado por la EEC). En el segundo ceco, las bajas ($n = 80$) se concentraron en 22 de las 69 camadas (el 32 % de las camadas). Se vió que la camada como efecto fijo explicaba un 57,5 y 47,0 % de la variabilidad total en el primer y segundo ceco respectivamente (Tabla 1).

Las tres camadas que mayor mortalidad presentaron en el primer ceco fueron las camadas 2, 7 y 23 (50, 87,5 y 20 % respectivamente). Los conteos de células vegetativas de *C. perfringens* en los cecótrofos de estas conejas fueron, al día siguiente del destete del segundo ceco: 6000, 3000 y 50000 UFC/g. Así mismo, el número de esporas de *C. perfringens* hallado en el nido de estas madres fue respectivamente de: 900000, 14000 y 700000 UFC/g. Del mismo modo, se eligieron tres conejas (33, 48 y 74) cuyas camadas concluyeron íntegramente el primer ceco. Los conteos de células vegetativas de *C. perfringens* en los cecótrofos de estas madres fueron: 4000, 40000 y 120000 UFC/g y la carga en esporas de sus nidos ascendió respectivamente a: 1000000, 1100000 y 6000 UFC/g. Si bien el número de conejas muestreadas es muy bajo, de estos valores se deduce que no hubo diferencias entre los dos grupos de conejas ni en cuanto a los conteos en cecótrofos ni en lo que respecta a la carga de los nidos en esporas de *C. perfringens*. Estas observaciones concuerdan con el mayor grado de similitud de la microbiota cecal que existe entre hermanos de una misma camada (similitud del 39 %) que el que hay entre éstos y la madre (similitud del 10 %; García et al., 2005). Se podría por tanto descartar que el efecto de la camada fuera una contaminación de los gazapos por una malas condiciones higiénicas del nido. Cabe señalar igualmente que, en el segundo ceco, ninguna de las conejas, con alto porcentaje de mortalidad de gazapos en el primer ceco, presentó bajas. Por el contrario, la coneja 48, cuyos gazapos alcanzaron en su totalidad el peso final de sacrificio en el primer ceco, presentó un 88,8 % de mortalidad en el segundo periodo. Por tanto, aunque el efecto camada es importante en ambos cebos, las camadas de una misma coneja no se comportaron igual en los dos periodos sucesivos.

La contaminación ambiental del aire de la nave, expresada como la concentración de esporas de *C. perfringens* en el polvo de los extractores, evolucionó como se muestra en la tabla 1. En ambos casos, se observa que la carga ambiental en esporas aumentó con el tiempo. No obstante, los valores obtenidos en el segundo ceco fueron más altos que los del primero. Esta diferencia de las condiciones ambientales de la nave podría estar relacionada con los diferentes porcentajes de mortalidad observados (2,97 y 12,2 %). Peores condiciones higiénicas podrían ser la causa de una mayor incidencia de la EEC. Así, Licois et al. (2003) lograron reproducir la EEC, en animales totalmente sanos, a partir de muestras de aire tomadas en el ambiente de naves en las que se habían alojado gazapos enfermos de enteropatía. Sin embargo, un incremento en el número de esporas del aire también podría derivar de la proliferación patogénica de *C. perfringens* en el ciego de los animales

enfermos. Así, en el primer cebo, los conteos cecales de células vegetativas de *C. perfringens* en tres animales afectados por la EEC fueron: 8, 21 y 29 x 10⁶ UFC/g. En el segundo cebo se analizó el contenido cecal de siete animales enfermos y, exceptuando dos animales, los conteos de *C. perfringens* fueron siempre superiores a 10⁶ UFC/g. Estos valores coinciden con el umbral establecido (> 2 x 10⁶ UFC/g de contenido cecal) por Romero et al. (2007) para la aparición de síntomas de la EEC.

Tras haber registrado diariamente el número de bajas, se observó que la mayoría de los animales fallecían en torno a los 14 días post-destete con independencia de la edad a la que se hubiera efectuado éste (10,86 ± 4,25 (Desv. Típica) y 11,5 ± 2,27 días post-destete). Este hecho ha sido también detectado por otros autores (Garrido et al., 2006).

Tabla 1. Efecto de la camada y de las condiciones ambientales en relación con el porcentaje de mortalidad de EEC en los dos periodos de cebo.

	Mortalidad EEC (%) ¹	Conteo de esporas de <i>C. perfringens</i> en el aire de la nave (x 10 ³ UFC/g)			Efecto de la camada sobre la mortalidad	
		0 d post-destete	14 d post-destete	Fin de cebo	Variabilidad explicada (%)	Camadas con bajas (%)
Primer cebo	2,97	2,10	9,40	56,0	57,5 (P<0,001)	10
Segundo cebo	12,2	8,80	50,0	300,0	47,0 (P<0,001)	32

¹ Sobre el total de animales cebados.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Eureka E! 3854.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- García J., Nicodemus N., Carabaño R., Villamide M.J., De Blas C. 2001. *World.R.Sci.* 9 : 27-32.
- García J., Gómez-Conde M.S., Chamorro S., Nicodemus N., De Blas C., Carabaño R., Pérez de Rozas A., Badiola I. 2005. *ASESCU* 157-165.
- Garrido S., Nicodemus N., Chamorro S. De Blas J.C. 2006. *ASESCU* 95-101.
- Le Normand B., Le Guenec J., Moalic P.Y. 2003. *J. Rech. Cunicole* 239-241.
- Licois D., Dewrée R., Coudert P., Vindevogel H., Marlier D. 2003. *J. Rech. Cunicole* 255-258.
- Romero C., Nicodemus N., Corujo A., Astillero J.R., De Blas J.C. 2007. *J. Rech. Cunicole* 85-88.
- SAS 1991. SAS Inst. Inc, Cary NC, USA.

EFFECT OF LITTER AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON THE MORTALITY RATE OF FATTENING RABBITS IN PERIODS WITH DIFFERENT INCIDENCE OF EPIZOOTIC RABBIT ENTEROPATHY

ABSTRACT: Very few works report the effect of litter on rabbits microflora and their mortality rate. However, the proportion of variance of productive traits explained by litter ranges from 24.5 to 62.6 %. Thorough disinfection in farms has also been proved to be a useful strategy to prevent outbreaks of Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) and the proliferation of bacterium *Clostridium perfringens*. Thus, this work aims to estimate the effect of litter and environment on young rabbit mortality due to ERE and *C. perfringens* concentration in caecal contents, throughout two consecutive fattening periods. In the first period, the mortality rate was 2.97 % whereas in the second one, it rose up to 12.2 % (P < 0.001). This increase was parallel to an increment in air concentration of spores of *C. perfringens* (56000 vs 300000). Litter accounted for 57.5 and 47.0 % of mortality variance in each period. It did not appear to exist a relation between litter mortality rate and the concentration of spores of *C. perfringens* in the nest nor with *C. perfringens* colonies count in the soft faeces of the mother. *C. perfringens* concentration in caecal contents was positively related to the observation of clinical signs of ERE, which mostly appear around the 14th day after weaning, irrespective of the date the latter occurred. As a conclusion, rabbits of the same litter should always be distributed across treatments to avoid the possible effect of litter.

Keywords: Litter, Environment, *Clostridium perfringens*, Epizootic Rabbit Enteropathy

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE MAEDI-VISNA EN LAS EXPLOTACIONES DE OVINO DE CARNE EN LA PROVINCIA DE LUGO

Fernández, G.¹, Lago, N.¹, Pato, F.J.¹, Viña, M.², Cienfuegos, S.¹, López, C.¹, Vázquez, L.¹ y Dacal, V.¹

¹Dpto. Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo: franciscoj.pato@rai.usc.es. ²Asociación de Defensa de Ovino y Caprino de Galicia "ACIVO".

INTRODUCCIÓN

El Maedi-Visna es una enfermedad vírica que afecta a los ovinos y que se caracteriza por provocar una inflamación crónica de los pulmones, glándulas mamarias, articulaciones y sistema nervioso central, además de linfadenopatía y caquexia (Narayan y Clements, 1989). El agente causal fue aislado por primera vez del sistema nervioso de una oveja en 1960 (Sigurdsson et al., 1960) siendo posteriormente clasificado como un miembro del género Lentivirus, familia Retroviridae. La enfermedad tiene carácter insidioso y progresivo, de forma que pueden pasar años desde la infección hasta que se desarrollen síntomas clínicos. Solamente una pequeña proporción de los animales infectados llegan a desarrollarlos y normalmente se trata de animales con más de dos años de edad.

La enfermedad puede presentar cuatro cuadros clínicos, que en orden de importancia son: pulmonar (maedi), mamario, nervioso (visna) y articular, aunque cabe señalar que la frecuencia de estos varía según la zona geográfica, tropismo de la cepa vírica, raza del animal, carga genética individual, edad y vía inicial de exposición (Luján y Badiola, 2001). La transmisión se produce principalmente a través de dos vías: aerógena y lactogénica. Los animales infectados, incluso los asintomáticos, presentan el virus en sus secreciones pulmonares, calostro y leche y por lo tanto son fuente de infección para las crías y otras ovejas del rebaño. Tras la infección se produce una respuesta inmunitaria de forma que pueden detectarse anticuerpos específicos, aunque la seroconversión puede ocurrir en un periodo de tiempo variable, desde pocas semanas hasta varios meses post-infección. Las principales células infectadas son los monocitos y macrófagos.

Al no considerarse una zoonosis la importancia de la enfermedad se refiere a las consecuencias económicas a las que puede dar lugar, asociadas principalmente a la mortalidad en aquellos animales sintomáticos y a los efectos sobre la producción en aquellos animales con presentación subclínica (Radostits et al., 2000), como son menor producción de leche, aumento de la mortalidad de los corderos antes del destete y menor peso de los corderos tanto al nacimiento como al destete.

El MV ha sido reconocido en la mayor parte de los países con mayor producción ovina, incluyendo: España (Gonzalez et al., 1984), Holanda (De Boer et al., 1978), Francia (Savey et al., 1981) y Grecia (Exarchopoulos, 1967). Australia y Nueva Zelanda son los únicos países que han descrito infecciones por lentivirus en cabras pero no en ovejas (Greenwood et al., 1995). La seroprevalencia en España no es conocida en todo el territorio, aunque existen diferentes investigaciones al respecto en algunas comunidades autónomas que han demostrado un alto porcentaje de infección.

La infección por MVV se puede diagnosticar mediante análisis de los signos clínicos, estudio anatomopatológico e histopatológico, análisis inmunológico, aislamiento vírico y PCR. La respuesta humoral generada por MVV se mantiene a lo largo de la vida del animal y resulta muy útil para poder llegar a un diagnóstico definitivo. Así se han desarrollado distintas pruebas serológicas como la inmunodifusión en gel de agar y ELISA. No existe tratamiento ni vacunación efectivos. Es por ello que se hacen imprescindibles medidas de prevención y control de la enfermedad a través de un correcto manejo del rebaño, teniendo siempre en cuenta tanto la estructura como la prevalencia de la enfermedad existente en el mismo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la realización de este estudio se contó con la colaboración de 47 explotaciones de ovino de la provincia lucense, todas ellas pertenecientes a la Asociación de Defensa de Ovino y Caprino de Galicia "ACIVO", correspondiéndose con un total de 8096 animales (7928 hembras, 168 machos). Los rebaños fueron elegidos en función de la disposición de

los ganaderos, teniendo en cuenta la representatividad de la mayoría de los municipios y con una media de 174 animales por rebaño. En cada explotación se tomaron muestras de todos los animales mayores de 6 meses, tanto de ovejas como de cabras en el caso de coexistir y se realizó una encuesta epidemiológica con el objetivo de conocer tanto el tipo de sistema productivo como los antecedentes sanitarios.

Dividimos a la población en tres grupos, clasificándolos según el tamaño de la explotación; así distinguimos: grupo 1 (de 1 a 100 animales), grupo 2 (de 101 a 180) y grupo 3 (más de 180). De forma paralela se formaron los grupos A, B y C, clasificando los animales según su edad: grupo A (menores de 12 meses), grupo B (de 13 a 48 meses) y grupo C (mayores de 49 meses).

Como método diagnóstico se empleó el ELISA comercial de los laboratorios Pourquier (Pourquier® ELISA Maedi-Visna/CAEV Serum, Indirect ELISA / Screening). La prevalencia real de animales seropositivos se calculó en función de la sensibilidad y especificidad de la técnica (Se: 0,978/ Sp: 0,973; Toft et al., 2005) y de la prevalencia aparente obtenida, según la siguiente fórmula: $PR = (PA + Sp - 1) / (Se + Sp - 1)$ (Noordhuizen et al., 1997). Para valorar la significación de las diferencias según diversos factores se utilizó el estadístico Chi Cuadrado de Pearson con un nivel de confianza del 95 y 99%, el Odds Ratio con el cálculo de los intervalos de confianza y la técnica estadística de Chaid Exhaustivo. Para los cálculos estadísticos se empleó la aplicación informática SPSS 16.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las prevalencias generales encontradas fueron una prevalencia aparente de la enfermedad de 21,60% y una prevalencia real de 22,69%. Sin embargo la PA por rebaño resultó mayor, con un valor del 74,47%. En Galicia no existen datos epidemiológicos al respecto, pero esta prevalencia obtenida es ligeramente menor a las detectadas en otras comunidades autónomas, como en el caso del País Vasco, donde la infección está presente en el 95% de las explotaciones (González, 1989) o como en Aragón, Navarra y la Rioja (95-97,8%). La prevalencia de rebaño obtenida en nuestro estudio se acerca más a la detectada en León, siendo esta de un 66%, y alejándose de observada en Ávila, Murcia y Madrid, donde ésta fue menor, 30%, 21,7% y 43,4% respectivamente (Sotelo et al., 1995; Reviriego, 1998).

Al considerar el tamaño de la explotación la prevalencia fue mucho mayor en el grupo 3 (PA 28,91%, PR 30,37%), es decir, en aquellos rebaños de mayor tamaño, mientras que la prevalencia menor resultó en los animales del grupo 1 (PA 3,83%, PR 4,00%). Se observó diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la seropositividad en explotaciones de menor tamaño (grupo 1) y la seropositividad en las explotaciones de mayor tamaño (grupo 2 y 3). Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente por otros autores (Simmard y Morley, 1991); sin embargo estudios realizados en Canadá (Campbell et al., 1994) no se encontraron dichas diferencias. Esto puede ser debido a que las explotaciones de mayor tamaño suelen tener una mayor incorporación de animales provenientes de otras explotaciones, existiendo un mayor riesgo de introducción de la enfermedad en comparación con las explotaciones pequeñas. Esto hace que la posibilidad de establecer explotaciones libres sea mayor en las explotaciones de menor tamaño.

Los factores individuales considerados han sido: edad, sexo y especie. En cuanto a la edad las PR y PA fueron menores en el grupo A (PA 6,81; PR 7,13), formado por animales de menor edad, y de un valor superior en caso de los animales del grupo C (PA 25,68%; PR 26,98%), formado por los animales adultos. Se observaron diferencias significativas entre la seropositividad al MV y la edad del animal ($p < 0,01$), habiendo una relación positiva entre ambas. La existencia de esta relación se describe en otros estudios, donde se ha observado que el riesgo de seropositividad aumenta con la edad del animal; muchos autores coinciden en que esta relación es debida al mayor tiempo de contacto de los animales viejos con los animales infectados, en comparación con los animales jóvenes (Simmard y Morley, 1991). Este efecto también podría ser debido a un largo periodo de tiempo entre la infección mediante la vía lactogénica y la seroconversión. Es necesario conocer la importancia relativa de las dos vías de contagio en el sistema de producción de ovino de Galicia, caracterizado por un sistema de manejo semiintensivo con confinamiento entre 14 y 20 horas dependiendo de la estación del año, y un destete anterior a los 2 meses de edad.

Al considerar el sexo del animal no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$); esto coincide con lo observado por otros autores (Schaller et al., 1995). Sin embargo, en otros estudios si detectaron una asociación entre el sexo y la seropositividad a MV, aunque estos autores atribuyeron las diferencias al distinto manejo de los machos y las hembras en la mayoría de los rebaños (Simard y Morley, 1991). En cuanto a la diferencias entre especies, las prevalencias fueron mucho mayores en caso de los ovinos (PA 22,35%) que en los caprinos (PA 4,22%) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Durante mucho tiempo se consideró a las infecciones por lentivirus de ovino y caprino como específicas de especie. Varias investigaciones indican que existe el salto interespecie, especialmente por la utilización de leche infectada en la alimentación de una a otra (Peterhans et al., 2004). En nuestro caso debemos considerar la posibilidad de que la transmisión sea horizontal, ya que tal práctica de manejo no suele realizarse en las explotaciones estudiadas. Por otro lado esto nos muestra la necesidad de tener en cuenta a todos los pequeños rumiantes a la hora de establecer un programa de prevención y control de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Narayan, O., Clements, J.E. 1989. *J. Gen. Virol.* 70, 1617–1639. • Sigurdsson, B., Thormar, H., Pálsson, P.A., 1960. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 10, 368– 381. • Luján, L., Badiola, J. J. 2001. *Ovis* 72 • Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. 2000. *Vet. Med.*, 1186–1189. • González, L., Badiola, J.J., Gelabert, J.L., 1984. *Medic. Vet.* 1, 277–284. • De-Boer, G.F., Terpstra, C., Houwers, D.J., 1978. *Office Intern. Epizoot.* 89, 487-506. • Savey M., Espinasse J., Parodi A.L., 1981. *Vet. Rec.* 103, 65. • Exarchopoulos, G.V., 1967. Ph.D. Thesis. Greece. • Greenwood, P.L., North, R.N., Kirkland, P.D., 1995. *Aust. Vet. J.* 72, 341-345 • Toft, N., Akerstedt, J., Tharaldsen, J., Hopp, P. 2007. *Vet. Microbiol.* 120, 77–86. • Noordhuizen et al, 1997. Wageningen. Page 76. • González, 1989. Ph.D. Thesis. Universidad de Zaragoza, Spain. • Sotelo JM, Gutiérrez A, Fernández M, Cármenes P, Muñoz M 1995. IV Congreso Nacional de Virología. • Reviriego, Fj., 1998. *Albéitar* 21: 15. • Simard, C., Morley, R.S., 1991. *Can. J. Vet. Res.* 55 (3), 269–273. • Campbell, B.J., Menzies, P., Waltner-Toews, D., Walton, J.S., Buckrell, B.C., Thorsen, J. 1994. *Can. vet. J.* 35, 39-44. • Schaller, P., Zanoni, R., Vogt, H.R., Strasser, M., Peterhans, E., Schwyzer, M., Ackermann, M. 1995. Proceedings 3rd Congress of the European Society for Veterinary Virology Interlaken, Switzerland, 4-7. • Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Eliaszewicz, M., Juste, R.A., Krassnig, R., Lafont, J.P., Lenihan, P., Petursson, G., Pritchard, G., Thorley, J., Vitu, C., Mornex, J.F., Pepin, M., 2004. *Vet. Res.* 35, 257–274.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación PGDIT06RAG26101PR de la Xunta de Galicia.

SEROPREVALENCE OF MAEDI-VISNA DISEASE IN MEAT SHEEP FLOCKS IN THE PROVINCE OF LUGO

ABSTRACT: Maedi-visna (MV) is a relatively common chronic infection of sheep resulting in economic loss to the sheep industry. The objective of this study was to measure the seroprevalence of MV infection in sheep flocks in Lugo. A total of 8096 animals were tested using a commercially available ELISA test in order to detect antibodies against MVV. The prevalence of positive animals were 21,60% in contrast to the 74,47% of positive flocks. There were significant differences in prevalence between flock size and serologic results, so seroprevalence seemed to decrease in small flocks. There were significant differences in prevalence between age of animals and serologic results too (it increase with the age of animals). This study indicates that MV is relatively common in Galician sheep so a specific control programme, adapted to rearing system, prevalence and management conditions should be chosen.

Keywords: *Maedi-Visna; seroprevalence; Galicia.*

COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES EN OVINOS CON CUADRO CLÍNICO NERVIOSO (VISNA)

Ramírez, H.¹, Hernández, M. M.¹, Cenoz, A.¹, Glaría, I.¹, de Andrés, X.¹, Crespo, H.¹, San Román, B.¹, Jáuregui, P.¹, Reina, R.¹, Grilló, M. J.¹, Benavides, J.², Polledo, L.², Pérez, V.², García-Marín, J. F.², Amorena, B.¹, de Andrés, D.¹

¹Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra, Mutilva Baja, Navarra. hugo.ramirez@unavarra.es. ²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, León.

INTRODUCCIÓN

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) causan artritis, mastitis, neumonía intersticial (Maedi) y leucoencefalitis (Visna) en ovinos y caprinos. Durante la infección los LVPR podrían colonizar diferentes órganos del individuo en los que aparecerían algunas poblaciones virales diferentes, como se ha descrito en infecciones por lentivirus de otras especies (Chen, 2006; Liu, 2006). Esta distribución de secuencias concretas en distintos órganos se ha denominado compartimentalización. El sistema nervioso central (SNC) ofrece un medio ambiente único para los LVPR, ya que cuenta con la presencia de la barrera hemato-encefálica que restringe el tráfico viral y la respuesta inmune. Diversos trabajos describen la compartimentalización en VIH, encontrándose una alta variación de las secuencias nucleotídicas, particularmente en zonas hipervariables de la región *env*. La región hipervariable V3 en VIH es determinante del tropismo celular y de la eficiencia de la replicación al relacionarse con la adsorción y fusión del virus a la célula en cepas macrófago-trópicas (Korber, 1994). Además, en individuos infectados crónicamente, ciertos aminoácidos de la región V3 modulan el neurotropismo y neurovirulencia (Pillai, 2006). En el ámbito de los LVPR existe una región hipervariable (V4) análoga a la V3 de VIH (Pisoni, 2007) y, hasta la fecha, se ha observado una compartimentalización en la mama de algunos individuos afectados por la forma mamaria (Pisoni, 2007), pero no se ha determinado la posible existencia de compartimentalización en el sistema nervioso correspondiente a la forma nerviosa de la enfermedad, lo que constituye el objetivo primordial de este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se determinaron 150 secuencias de la región V4 de VMV a partir de dos ovinos de raza Assaf, un macho (mayor de 2 años, denominado **A**) y una hembra (mayor de 4 años, denominada **B**) procedentes de un brote nervioso de la enfermedad en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Ambos animales murieron con sintomatología clínica nerviosa, encontrando macroscópicamente principalmente lesiones de malacia en la sustancia blanca del encéfalo e histológicamente mielitis. Además, se encontraron lesiones leves en pulmón y mama en los animales **A** y **B**, respectivamente. Para la obtención de las secuencias, en primer lugar se extrajeron muestras de médula espinal, plexo coroideo, mama o testículo, pulmón, lavado broncoalveolar (BAL) y sangre (células mononucleares, PBMC). De dichas muestras se extrajo ADN utilizando QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) y se realizaron por triplicado diluciones quintuplas seriadas (dilución limitante), para evitar la presencia de distintos moldes de ADN en la muestra. Mediante PCR, se amplificó la región V4 con cebadores *env* previamente descritos (Mordasini, 2006). Los amplicones se purificaron, ligaron y clonaron en el vector pGEMT-easy[®]. Se seleccionaron entre 50 y 75 colonias supuestamente positivas y se realizó la extracción del ADN plasmídico con Quantum Prep[®] (Bio-Rad). El ADN obtenido se secuenció, las secuencias (150) se analizaron con el programa Clustal X y los árboles filogenéticos se construyeron con el método de Neighbour Joining con corrección de Kimura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras obtenidas de los dos animales utilizados en este estudio se obtuvieron secuencias nucleotídicas, a excepción del testículo. El análisis de compartimentalización demostró que ésta existía en el animal **A** (Fig. 1A), pues las secuencias VMV derivadas de médula espinal y plexo coroideo mostraron una similitud entre sí de más del 98 %, lo que las ubicó filogenéticamente dentro de un mismo grupo. Dichas secuencias, a su vez, mostraron una similitud algo menor (95–97,8%) con algunas secuencias de VMV obtenidas de macrófagos BAL pero formaron en conjunto una única rama en el correspondiente árbol. Las restantes secuencias obtenidas de VMV de pulmón, PBMC y BAL se entremezclaron en diferentes ramas, formadas con grupos de secuencias filogenéticamente similares ($\geq 85,3\%$). En el animal **B** (Fig. 1B), se observó una gran heterogeneidad entre las diferentes secuencias derivadas de SNC. El árbol filogenético mostró 3 ramas bien definidas: i) una que sólo agrupó (similitud: 95,4-98,4%) 3 secuencias derivadas de PBMC y 2 derivadas de pulmón (debido a su pequeño número, no es posible determinar con certeza la existencia de compartimentalización); ii) otra que agrupó (similitud: 87,8-100%) secuencias derivadas de médula espinal, plexo coroideo, mama y PBMC; y iii) otra que agrupó (similitud: 96,4-100%) todas las secuencias derivadas de macrófagos BAL y algunas obtenidas de médula espinal, plexo coroideo, mama y PBMC. Fue muy interesante observar que las distancias filogenéticas entre la tercera rama y las otras dos eran muy grandes (la divergencia alcanzando hasta el 25,6%).

En conclusión, se encontró una evidente compartimentalización en secuencias virales derivadas de SNC en el animal **A** y no así entre las secuencias derivadas del SNC del animal **B**.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen, M.F., Westmoreland, S., Ryzhova, E.V., et al. 2006. *J Neurovirol.* 12: 73-89.
- Korber, B.T., Kunstman, K.J., Patterson, B.K., et al. 1994. *J Virol.* 68(11): 7467-7481.
- Liu, P., Hudson, L.C., Tompkins, M.B., et al. 2006. *J Neurovirol.* 12: 307-321.
- Mordasini, F., Vogt, H.R., Zahno, M.L., et al. 2006. *J Clin Microbiol.* 3: 981-991.
- Pillai, S.K., Pond, S.L., Liu, Y., et al. 2006. *Brain.* 129: 1872-1883.
- Pisoni, G., Moroni, P., Turín, L. & Bertoni, G. 2007. *Virology.* 369: 119-130

Agradecimientos: Financiado por CICYT (AGL2007-66874-C04) y Gobierno de Navarra (IIQ010449.RI1).

COMPARTMENTALIZATION IN THE VISNA CLINICAL FORM OF SHEEP SMALL RUMINANT LENTIVIRUS INFECTION

ABSTRACT: A total of 150 sequences of the V4 hypervariable *env* region of sheep small ruminant lentivirus (SRLV) genome was obtained from two Assaf sheep of a sheep nervous outbreak, both with clinical visna signs. These sequences were obtained from spinal cord, choroid plexus, mammary gland, lung, bronchoalveolar (BAL) macrophages and blood (PBMC). Phylogenetic analysis demonstrated a clear compartmentalization in one of these sheep, a 2-year old male, as VMV sequences derived from spinal cord and choroid plexus had a similarity amongst them higher than 98%, which allowed them to be grouped into a differentiated genetic group. In the other animal (a 4-year old female) there was no such a clear compartmentalization and there were three definite clusters, one of which was genetically distant from the other two.

Keywords: *Compartmentalization, visna, small-ruminant-lentivirus, sheep*

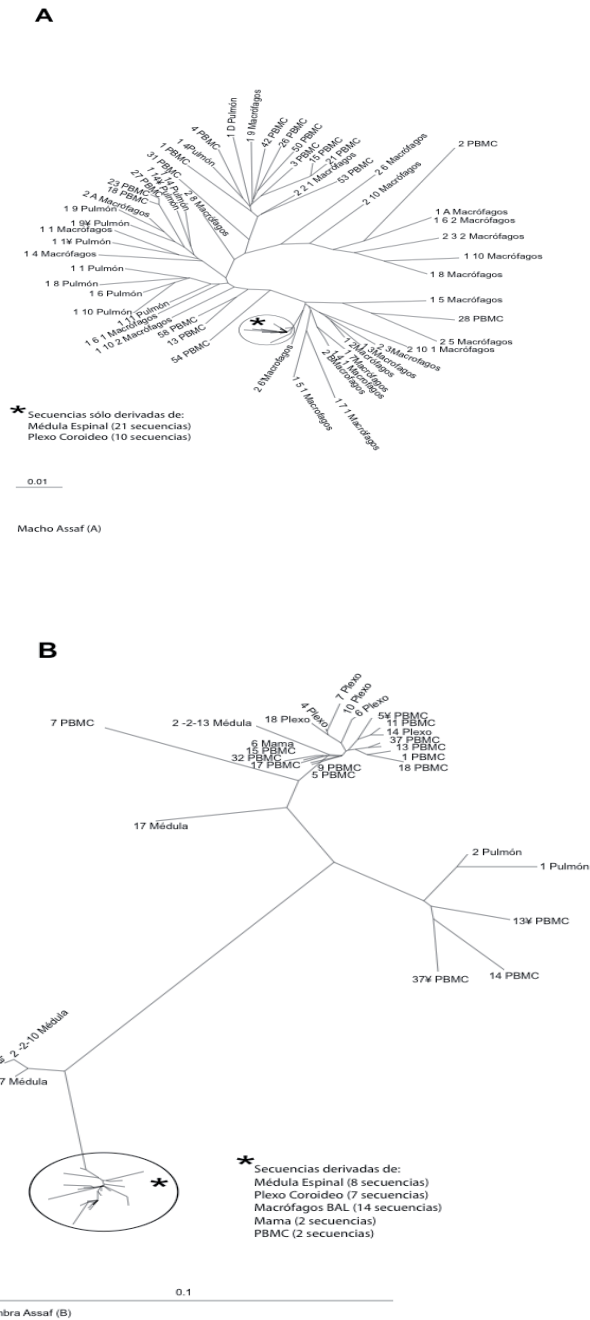


Figura 1. Árboles filogenéticos correspondientes a las 150 secuencias obtenidas a partir de SNC (médula espinal y plexo coroideo), pulmón, BAL, mama y PBMC de la región V4 de env en LVPR de un macho (A) y una hembra (B) de raza Assaf.

EFFECTO ASOCIADO A LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN VACUNACIÓN ADN FRENTE AL VIRUS DEL MAEDI-VISNA

de Andrés¹, X., Reina¹, R., Ramírez¹, H., Crespo¹, H., Glaría¹, I., Pérez², M., Grilló¹, MJ., Luján², L., Blacklaws³, B., Niesalla⁴, H., Harkiss⁴, G., de Andrés¹, D. y Amorena¹, B.

¹Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra; ²Universidad de Zaragoza; ³University of Cambridge, Cambridge, UK; ⁴University of Edinburgh, Edinburgh, UK ximena.deandres@unavarra.es.

INTRODUCCIÓN

El virus del Maedi/visna (VMV) infecta al ganado ovino y caprino y pertenece al ampliamente extendido grupo de lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) (Glaría et al, 2003). Hasta el momento, las estrategias seguidas para la eliminación de LVPR se han basado en el diagnóstico de la infección y sacrificio de los animales seropositivos, pero no se han desarrollado vacunas que prevengan eficazmente la infección. En especies como la equina, primates no humanos y humanos, el control de la viremia inicial tras la infección por lentivirus está asociado a la presencia de los linfocitos T citotóxicos (CTL) (McGuire et al., 2004), si bien en las infecciones por VMV también se han detectado CTL en animales infectados (Blacklaws et al., 1994, 1995b). Las vacunas generadas hasta el momento frente al VMV han conseguido disminuir la carga viral tras el desafío con el VMV pero no prevenir la infección vírica crónica y pueden provocar un aumento de la lesión en órganos diana (Reina et al., 2008). Algunas de ellas son vacunas ADN, capaces de generar respuestas inmunes mediadas por células o por anticuerpos (Donnelly et al., 2005). En este estudio, hemos realizado un análisis comparativo de los efectos que ejerce una vacunación conjunta con plásmidos recombinantes, que incluyen los genes *gag* y *env* del VMV, en presencia o no de plásmidos recombinantes para distintos adyuvantes inmunológicos (molécula coestimuladora CD80 sólo o con CD86; o interferón gamma, IFN- γ), sobre la respuesta inmune celular y si dicha respuesta ejerce una protección eficaz frente a la infección y/o las respuestas inflamatorias (aparición de lesiones).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 37 animales raza Lleyn de un año de edad, libres de VMV. La inmunización se realizó por la vía epidérmica mediante el método balístico en las semanas 0 y 4 con plásmidos pN3 recombinantes, concretamente pN3-*gag* y pN3-*env*, en presencia o no de los adyuvantes pN3-*CD80*, pN3-*CD86* o pN3-*IFN* (10 μ g/plásmido/inóculo/animal), estableciéndose los grupos de inmunización indicados en la Tabla 1 y un grupo control inoculado con pN3 sin inserto. Se realizó un recuerdo (semana 10) con el virus vaccinia Ankara recombinante (MVA) que expresaba el gen *gag* (MVA-*gag*) y el *env* (MVA-*env*) del VMV. El desafío con el VMV se realizó con 1×10^3 TCID₅₀ a las 12 semanas de la primera inmunización por la vía intra-traqueal. El protocolo de inmunización-desafío utilizado fue el descrito previamente (Niesalla et al., 2009). Se recogieron muestras de sangre de cada animal a tiempo 0 y en las semanas 7, 12, 16, 20 y 24 y se extrajo suero para los ensayos de respuesta de anticuerpos a la vez que se aislaron células mononucleadas sanguíneas (PBMC) para los ensayos de medición de respuesta celular (respuesta linfoproliferativa frente a antígenos GAG del VMV y actividad CTL frente a fibroblastos infectados con VMV) según la metodología descrita (Reina et al., 2008). El grado de protección se cuantificó determinando la carga proviral por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) de la región *gag* en sangre, pulmón y ganglio mediastínico (MLN) y el grado de inflamación/lesión de dichos órganos post-mortem (Reina et al., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la inmunización con plásmidos *env* y *gag*, el recuerdo con un MVA recombinante (MVA-*gag* y MVA-*env*) y el desafío con VMV, en los 4 grupos inmunizados (Tabla1) se observaron

diferencias significativas en respuesta inmune celular respecto del control sin inmunizar (n= 7-8 ovinos por grupo), a las semanas indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen del estudio comparativo de los grupos inmunizados con DNA y sometidos a un desafío por VMV: respuesta inmune celular linfoproliferativa y de actividad CTL antes del desafío y protección frente a la infección e índice lesional en examen post-mortem.

Grupos inmunización	Respuesta inmune celular previamente al desafío con VMV		Protección tras el desafío con VMV		
	Linfoproliferativa	Actividad CTL (% animales)	Porcentaje de animales infectados		Índice lesional
			Sangre	Pulmón y MLN	
<i>gag-env</i>	Semana 12*	Semana 12 (57%)	100	42,8	0,133
<i>gag-env-CD80</i>	Semana 12*	Semana 7 (25%)	100	71,4	0,222*
<i>gag-env- CD80-CD86</i>	Semana 7*, 12*	Semana 7* (62,5%)	50	25	0,233*
<i>gag-env-IFN</i>	Semana 7*, 12*	Semana 7 (48,5%)	100	57,2	0,120

* Diferencias significativas (P<0,05) respecto al grupo control.

La respuesta linfoproliferativa, generalmente de linfocitos Th, resultó significativa en todos los grupos inmunizados previamente al desafío con el VMV (semana 12), siendo más temprana (semana 7) en los grupos que recibieron ambas moléculas coestimuladoras CD80-CD86 y el grupo que recibió IFN- γ , aunque se desconocía el perfil Th1-Th2 (de ayuda a células CTL y B). Se detectó actividad CTL en todos los grupos inmunizados previamente al desafío con el VMV (semana 12), pero sólo los grupos que recibieron adyuvantes inmunológicos (moléculas CD80 y/o CD86; o IFN- γ) presentaron una respuesta CTL temprana (semana 7). Dentro de estos grupos, el que presentó mayor respuesta CTL en dicho momento fue el que recibió CD80+CD86 (62,5%), difiriendo significativamente del grupo control (P<0,05) seguido del grupo con IFN- γ (48,5%) y del grupo con CD80 sólo (25%), que no había mostrado diferencias en respuesta linfoproliferativa, a la semana 7. Por otra parte, el grupo inmunizado sólo con *gag-env* presentó respuesta CTL (57%) pero más tarde (en la semana 12) igual que había sucedido en la respuesta linfoproliferativa. Así, la presencia de moléculas coestimuladoras probablemente favoreció la presentación antigénica en la vacunación y generó linfocitos de memoria Th1 y pre-CTL. Tras el desafío con el virus (semana 12), los grupos que recibieron las moléculas coestimuladoras CD80 y/o CD86 presentaron menor número de animales CTL-positivos que el grupo control, mientras que los grupos con IFN- γ y *gag-env* lo duplicaron. Al determinar el efecto protector de la vacuna mediante Q-PCR se observó que el grupo que recibió ambas moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 mostró un grado de protección significativo, con un 50% de los animales libres de infección. Así, esta protección se hallaba asociada a una temprana respuesta significativa tanto de CTL como linfoproliferativa (semana 7). Ello permitiría una prolongada expansión clonal, formación de células de memoria pre-CTL y diseminación de las células CTL específicas de antígeno a distintos órganos eliminando al virus tras el desafío. Sin embargo, esta protección (ausencia de carga viral) en el grupo con CD80 y CD86, no conllevó un menor grado de lesiones en los órganos diana, pues éstos presentaron en dicho grupo un mayor índice de patología (lesión/inflamación) que el grupo control. Así, la respuesta celular aumentada tras la vacunación y el desafío con el virus parece resultar en un mayor grado lesional (infiltración linfoide y/o hiperplasia folicular). Este incremento significativo de la lesión se encontró en los dos grupos de animales inmunizados con moléculas B7. Sería necesario prolongar el período de estudio para determinar si estas lesiones terminarían por desaparecer o desembocarían en lesiones graves. En el caso del

grupo que recibió el IFN- γ , en el que la respuesta linfoproliferativa generada por la vacuna fue similar a la del grupo con CD80+CD86 y la respuesta CTL temprana no fue significativa pero sí fue elevada tras el desafío, no hubo protección frente a la infección,. En conjunto, estos resultados indican que el tiempo de aparición de respuesta celular, el tipo de respuesta (CTL, Th1, Th2), la calidad (memoria central frente a efectora) y la cantidad y distribución de las células CTL generadas por la vacuna son relevantes a la hora de eliminar el virus de los órganos diana. Finalmente, la producción de anticuerpos (inclusive neutralizantes) no se halló relacionada con la protección frente al virus en las condiciones empleadas en este estudio (datos no mostrados), ya que no fueron detectados previamente al desafío con el virus. En resumen, a pesar de la protección significativa frente a la infección obtenida en el grupo inmunizado en el que se indujo mayor y más temprana respuesta CTL (*gag-eng-CD80-CD86*), es necesario incrementar dicha protección y determinar si las lesiones en los órganos diana del virus tras el desafío desaparecen con el tiempo. El desarrollo de métodos que induzcan una respuesta inmune, disminuyan en mayor grado la proporción de animales infectados y eviten el desarrollo de lesiones duraderas es un desafío para futuros estudios de vacunación frente a LVPR.

REFERENCIAS

- Glaría, I., Reina, R., García, I., et al. 2003. *ITEA* 24:408-410.
- Blacklaws, B.A., Bird, P., Allen, D. & McConnell, I.J. 1994. *Gen Virol.*;75:1589-1596.
- Blacklaws, B., Bird, P. & McConnell, I. 1995. *Trends Microbiol.* 3:434-440.
- Donnelly, J.J., Wahren, B. & Liu, M.A. 2005. *J Immunol.* 175:633-639.
- Niesalla, H., de Andrés, X., Barbezange, C., et al. 2009. *Vaccine.* 27: 260-269.
- Reina, R., Glaría, I., Benavides, J., et al. 2007. *Viral Immunol.* 20:609-622.
- Reina, R., Berriatua, E., Luján, L., et al. 2008. *Vet J.*
- McGuire, T.C., Fraser, D.G. & Mealey, R.H. 2004. *Anim Health Res Rev.* 5:271-276.
- Reina, R., Barbezange, C., Niesalla, H., et al. 2008. *Vaccine.* 26:4494-4505.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por CICYT (AGL2003-08977-C03-01 y AGL2007-66874-C04) y Unión Europea (QLK2-CT-2002-00617).

EFFECT ASSOCIATED WITH CELLULAR IMMUNE RESPONSES UPON DNA-PRIME-BOOST IMMUNIZATION AGAINST VISNA/MAEDI VIRUS

ABSTRACT: Visna/Maedi virus (VMV) establishes a life-long infection of sheep and belongs to the small ruminant lentiviruses (SRLV). SRLV are widely spread and strategies based on early diagnosis, management and culling of seropositive animals have been applied in order to eradicate infection. However, efficient immunoprophylactic tools have not been developed against SRLV and immunization has not conferred sterilizing immunity so far. Cytotoxic T-lymphocytes (CTL) play an important role in immune control of both acute and chronic viral infections and are key immunological mediators of viral clearance. Thus, a vaccine against VMV that triggers CTL production would be expected to prevent infection and consequently, lesion development. In this study we have shown that a DNA-prime boost vaccination regime with two VMV genes (*gag* and *env*) and including or not an immunologic adjuvant (interferon-gamma, IFN- γ), B7 costimulatory molecules (*CD80* and/or *C86*) followed by VMV challenge has been assessed. The inclusion of immunologic adjuvants was successful in inducing a CTL response in sheep, but only the group with both B7 molecules (*gag-env-CD80-CD86*) was able to avoid partially virus infection (50% of the immunized animals were free of virus). Interestingly, lesion development (mononuclear infiltrates) in the target organs (lung and mediastinal lymph node) was not prevented in the protected group. Further studies to improve the degree of protection against infection and determine the evolution of the lesions originated upon vaccination-challenge are warranted.

Keywords: *cytotoxic T cells; Visna/Maedi virus; vaccines; protection; DNA immunization*

SEROPREVALENCIA DE *Neospora caninum* Y *Toxoplasma gondii* EN GANADO OVINO DE GALICIA

Panadero, R., Díaz, P., Cienfuegos, S., Paineira, A., López, C., Vázquez, L., Dacal, V., Lago, N., Pato, J., Fernández, G., Díez-Baños, P. y Morrono, P.

Departamento de Patología Animal: Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela, 27071 Lugo, España.

rosario.panadero@usc.es

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los últimos censos oficiales, en Galicia existen 24.216 explotaciones de ganado ovino con un total de 242.432 cabezas. En esta comunidad, el ganado ovino se mantiene tradicionalmente en un sistema semiextensivo e íntimamente ligado al ganado vacuno. Los abortos son una de las principales preocupaciones de los productores y veterinarios clínicos por sus implicaciones económicas, afectando tanto a la producción lechera como cárnica. Los procesos parasitarios que más afectan a la reproducción de los pequeños rumiantes son *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*. La infección por *T. gondii* supone una de las causas más frecuentes de abortos, malformaciones fetales, y partos prematuros en el ganado ovino, mientras que *Neospora*, diagnosticada frecuentemente en ganado vacuno de todo el mundo, está muy poco estudiada en ovino. Ambos parásitos presentan ciclos biológicos similares con diferentes hospedadores definitivos, félicos e cánidos, respectivamente, y similares hospedadores intermediarios que incluyen a un amplio rango de mamíferos. El grado de similitud entre ambos parásitos hace surgir la cuestión de si es frecuente la coinfección y de si su posible interacción es de tipo sinérgico o antagónico. Hasta el momento los únicos estudios en los que se ha determinado la seroprevalencia de ambos agentes en ovinos fueron los llevados a cabo en Brasil por Figliuolo et al. (2004) y Romanelli et al. (2007). En España hasta el momento no existe ningún estudio que aborde a presencia conjunta de estos parásitos en una misma explotación ovina.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, planteamos un estudio encaminado a establecer la seroprevalencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en ganado ovino gallego.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre de un total de 259 ovejas mayores de un año procedentes de 28 explotaciones de la provincia de Lugo. En todas las granjas examinadas los animales se mantienen en un régimen semiextensivo, permaneciendo en el pasto por el día y estabulados durante la noche. La mayor parte de las ovejas eran cruces de razas de aptitud cárnica. La sangre se tomó de la vena yugular, y posteriormente se obtuvo el suero que se congeló a -20°C hasta su posterior procesado. Para facilitar el análisis de los resultados se ha dividido la provincia de Lugo en tres zonas de acuerdo con sus condiciones orográficas y climáticas (Figura 1). Los anticuerpos específicos anti IgG de *Toxoplasma gondii* se detectaron mediante aglutinación directa (Toxo-Screen DA, Biomerieux). Cada suero se testó a la dilución 1:40 y 1:4000. Los sueros con un título $\geq 1:40$ (que se correspondían con una concentración de 4UI/ml de acuerdo con el suero de internacional de referencia de la OMS), fueron considerados positivos. Los anticuerpos anti-*Neospora* fueron detectados mediante un ELISA de competición (cELISA VMRD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Un suero se consideró positivo cuando su porcentaje de inhibición era $\geq 30\%$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia total para *T. gondii* fue del 49,4% (128/259). Este porcentaje resulta similar al encontrado por otros autores en cabras y ovejas de Córdoba, Madrid y Zaragoza, con seroprevalencias que oscilaron entre un 30 y un 50,5% (Moreno et al., 1991; Mainar et al., 1996; Marca et al., 1996). Hay que señalar que la mayor parte de los sueros positivos a la

dilución 1:40 lo fueron también a la dilución 1:4000, lo que de acuerdo con Dubey y Kirkbride (1989) podría ser indicativo de una infección aguda.

Al tener en cuenta las prevalencias registradas en las distintas áreas de la provincia de Lugo (Figura 2), la prueba Chi-cuadrado mostró diferencias significativas ($\chi^2=12.577$; $P< 0.01$). La prueba CHAID-exhaustivo reveló que la prevalencia en la Costa era significativamente inferior a la de las otras áreas ($F=13.108$; $P< 0.01$). Estas diferencias pueden atribuirse a diferencias en las condiciones climáticas que afectarían a la supervivencia de los ooquistes en el medio, o a la distinta presencia de gatos jóvenes en las explotaciones.

La seroprevalencia total por *N. caninum* fue del 12,3% (32/259), siendo los porcentajes por áreas del 16% en la Costa, 6,3% en la Montaña y 13,8% en el Centro. No obstante, la prueba Chi-cuadrado no mostró diferencias entre la prevalencia registrada en las distintas zonas de la provincia de Lugo ($\chi^2=4.020$; $P>0.05$).

El test de McNemar mostró diferencias estadísticas entre los porcentajes de infección por *Toxoplasma* y *Neospora* ($P< 0.001$), de modo que podemos afirmar que el ganado ovino gallego se encuentra mucho más expuesto a la infección por *T. gondii* que por *N. caninum*. La gran importancia de *T. gondii* como agente causante de zoonosis pone de relieve la necesidad de tomar medidas encaminadas a controlar la presencia de este parásito en las explotaciones de ganado ovino. Estas diferencias en las prevalencias de ambos parásitos en las ovejas, también fue observada por Romanelli et al. (2007) en Brasil, siendo la seroprevalencia del 51,4% para *T. gondii* y 9,5% para *Neospora*.

Al considerar la coinfección por ambos parásitos hay que señalar que el 71,9% (23/32) de los ovinos positivos a *Neospora* también lo eran a *Toxoplasma*, de modo que las ovejas positivas a *Toxoplasma* son más propensas ($OR=3.188$, $P< 0.01$) a padecer una infección por *Neospora*. Estos resultados coinciden con los de González et al. (2008) quienes encontraron que en ganado vacuno lechero de Galicia, los animales infectados por *T. gondii* presentaban una mayor seroprevalencia por *N. caninum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dubey J.P & Kirkbride C.A. 1989. *J. Parasitol.* 75 (5): 673-676.
- Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., Cortizo-Mella, J. & Mezo, M. 2008. *Parasitol Res.* 102: 243-249.
- Figliuolo L.P.C., Kasai, N., Ragozo, A.M.A., de Paula, V.S.O., Dias, R.A., Souza, S.L.P. & Gennari, S.M. 2004. *Ve. Parasitol.* 123: 161-166.
- Mainar, R., De la Cruz, C., Asensio, A., Domínguez, L. & Vazquez-Boland, J.A. 1996. *Vet Res Comm.* 20: 153-159.
- Marca, M. C., Ramos, J.J., Loste, A., Fernández, A. & Hernández, M. 1996. *Med. Vet.* 13: 503-506.
- Moreno, T., Martínez-Gómez, F. & Becerra, C. 1991. *Ann. Trop. Med Parasit.* 85: 287-288.
- Romanelli, P.R., Freire, R.L., Vidotto, O., Marana, E.R.M., Ogawa, L., De Paula, V.S.O., García, J.L. & Navarro, I.T. 2007. *Brazil. Res Vet Sci.* 82 (2): 202-207.



Figura 1. Áreas bioclimáticas de la provincia de Lugo

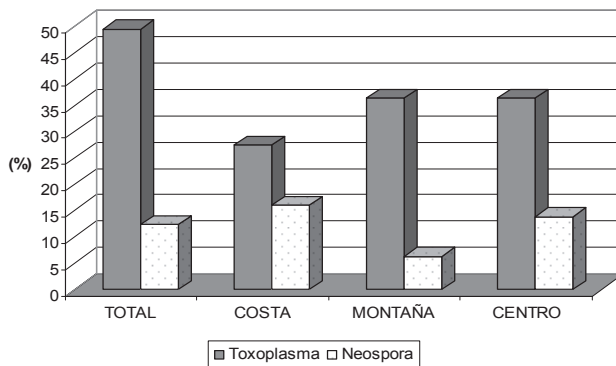


Figura 2. Seroprevalencia total por *Toxoplasma* y *Neospora* en la provincia de Lugo y en las distintas áreas climáticas.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Asociación de criadores de ganado ovino y caprino de Galicia (OVICA), y en especial a sus veterinarios clínicos, por su colaboración en la toma de muestras. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto de investigación PGIDIT06RAG26101PR (Xunta de Galicia).

SEROPREVALENCE BY *Neospora caninum* AND *Toxoplasma gondii* IN SHEEP FROM GALICIA

ABSTRACT: Sera from 259 sheep from Lugo Province (Galicia, NW Spain) were tested for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* using the direct agglutination test and a cELISA, respectively. The seroprevalence for *T. gondii* (49.4%) was higher than for *N. caninum* (12.3%). Statistically significant differences were observed among different geographical areas for *T. gondii* but not for *Neospora*, being the seroprevalence in the coastal area lower than in the mountainous and central areas. A high percentage (71.9%) of sheep positive for *Neospora* was also positive for *Toxoplasma*, revealing that the animals infected by *Toxoplasma* have more possibilities to become infected by *Neospora*.

Keywords: *Toxoplasma*, *Neospora*, sheep, Northwestern Spain.

PRODUCCION DE INTERFERON GAMA (IFN- γ), NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA GESTACION (PAG-1) Y ANTICUERPOS IgG1 E IgG2 DURANTE LA GESTACION EN VACAS DE APTITUD LECHERA CRÓNICAMENTE INFECTADAS POR *Neospora caninum*

Bech-Sàbat, G.^{1,*}, López-Gatius, F.¹, Nogareda, C.¹, García-Ispuerto, I.¹, Serrano, B.¹, Santolaria, P.², Yáñez, J.L.² y Almería, S.^{3,4}

¹Departamento de Producción Animal, Universitat de Lleida, ETSEA, 25198 Lleida. gbech@prodan.udl.cat. ²UCA y Departamento de Producción Animal, Universidad de Zaragoza, 22071 Huesca. ³Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, y ⁴Centro de Investigación en Sanidad Animal (CreSA), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos que inducen la inmunotolerancia materna respecto del feto, un cuerpo antigénicamente extraño, durante la gestación no son bien conocidos (Aagaard-Tillery et al., 2006). Los componentes más importantes de la respuesta inmune celular durante la gestación son las células T colaboradoras (Th) que regulan la respuesta celular por medio de citoquinas. Las citoquinas pueden clasificarse como “pro-inflamatorias”, producidas por células Th1 y “pro-gestacionales”, producidas por células Th2. Estos dos tipos de citoquinas estimulan la inmunidad celular y la respuesta humoral respectivamente (Wilczyński, 2005). Durante la gestación, aunque hay un cierto equilibrio Th1/Th2, se observa una tendencia hacia la actividad Th2, sobre todo en la mitad de la gestación, mientras que una excesiva actividad Th1 puede asociarse con la pérdida de la gestación (Roberston, 2000). Así, la mayor parte de las gestaciones se caracterizan por el predominio de la respuesta humoral con una producción incrementada de anticuerpos (Druckman y Druckman, 2005). El conflicto entre el proceso inmune y el reproductivo es todavía más complicado de entender en presencia de una infección parasitaria como la neosporosis bovina.

Neospora caninum, un protozoo intracelular, es considerado en la actualidad como la mayor causa de aborto e infección congénita en el ganado vacuno a nivel mundial (Dubey et al., 2007). El tipo de respuesta inmune Th1, relacionada con citoquinas pro-inflamatorias tales como el interferón gama (IFN- γ), parece esencial en el control de los protozoos intracelulares. Sin embargo, aunque la producción de IFN- γ es muy eficaz frente a la parasitación en las vacas infectadas no gestantes, puede favorecer el aborto en los animales gestantes (Williams y Trees, 2006). A pesar de ello, en un estudio reciente (López-Gatius et al., 2007a) el riesgo de aborto fue inexistente en vacas seropositivas a *N. caninum* que produjeron IFN- γ . Por otro lado, la producción de IFN- γ se ha relacionado con un incremento de la respuesta de anticuerpos del isotipo IgG2, también mediada por células Th1. El presente estudio evalúa las interacciones entre la producción de IFN- γ , los niveles plasmáticos de proteínas asociadas a la gestación (PAG-1), como medidores de bienestar feto-placentario, y la respuesta específica de anticuerpos IgG1 e IgG2 durante la gestación en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron muestras de sangre los días 40, 90, 120, 150, 180 y 210 de gestación o hasta el aborto de vacas lactantes de raza Holstein-Frisona. Se determinaron los valores plasmáticos de anticuerpos frente a *N. caninum* e IFN- γ y PAGs por técnicas ELISA y RIA, respectivamente, previamente validadas. (López-Gatius et al., 2004a; 2004b; 2007a; 2007b). Para la evaluación de las interacciones entre la producción de IFN- γ y PAG-1, los datos derivaron de 88 vacas: 62 seropositivas y 26 seronegativas que tuvieron un parto normal, mientras que en el caso de las interacciones entre la producción de IFN- γ y los serotipos IgG1 e IgG2, los datos derivaron de 31 vacas seropositivas, de las que 10 abortaron.

Para el análisis estadístico, se utilizaron métodos de medidas repetidas usando el GLM, paquete SPSS v14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacciones entre la producción de IFN- γ y PAG-1

Se detectó IFN- γ en el plasma de 14 de las 62 vacas seropositivas a *N. caninum*, mientras no se detectó en ninguna de las 26 seronegativas. Los niveles de PAG-1 no resultaron afectados por el número de lactación de las vacas, la producción de leche en el momento del diagnóstico de la gestación ni por la seropositividad a *N. caninum*. Los niveles de PAG-1 se correlacionaron positivamente con el periodo de la gestación ($P < 0.001$) y con la presencia de gestaciones gemelares ($P < 0.01$) confirmando trabajos previos (López-Gatius et al., 2007b; 2007c) y también se vieron afectados significativamente por la producción de IFN- γ . Las vacas *N. caninum*-seronegativas y seropositivas sin producción de IFN- γ presentaron valores superiores de PAG-1 a lo largo de la gestación, respecto de las seropositivas que produjeron IFN- γ ($P < 0.05$). Estos resultados sugieren que las concentraciones de PAG-1 plasmáticas disminuyen en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum* tras el desarrollo de una respuesta inmune celular, pero no se modifican con la presencia de anticuerpos frente al parásito.

Interacciones entre la producción de IFN- γ y los anticuerpos IgG1 e IgG2

Las vacas que no abortaron que produjeron IFN- γ ($n=10$) mostraron una relación IgG2/IgG1 más elevada ($P=0.01$) a lo largo de la gestación que las vacas que no produjeron IFN- γ ($n=11$). Se observó un efecto negativo significativo ($P < 0.05$) de la producción de IFN- γ sobre los niveles de IgG1, mientras los niveles plasmáticos de IgG2 no se vieron afectados por la producción de IFN- γ . En contraste, se registraron concentraciones más elevadas de IgG2 que IgG1 a lo largo de la gestación en los animales que abortaron, en ambos tipos de vacas, las que no produjeron IFN- γ y en la única que abortó produciendo la citoquina.

Conclusión

Nuestros datos indican que la producción de IFN- γ se correlaciona negativamente con los niveles plasmáticos de PAG-1 durante la gestación en vacas infectadas por *N. caninum* mientras la producción de anticuerpos frente *N. caninum* no se correlaciona con los niveles de PAG-1. Una respuesta inmune celular de tipo Th1, en la que los anticuerpos IgG2 prevalecen, podría disminuir el riesgo de aborto por *N. caninum*, pero sólo si se acompaña de la producción de IFN- γ . Elevados niveles de anticuerpos IgG2 por sí mismos, son insuficientes para proteger frente al aborto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard-Tillery, K.M., Silver, R. & Dalton, J. 2006. *Semin. Fetal Neonat. Med.* 11:279-95.
- Druckmann, R. & Druckmann, M.A. 2005. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97:389-96.
- Dubey, J.P., Schares, G. & Ortega-Mora, L.M. 2007. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:323-67.
- López-Gatius, F., Pabón, M. & Almería, S. 2004a. *Theriogen.* 62:606-13.
- López-Gatius, F., López-Béjar, M., Murugavel, K., Pabón, M., Ferrer, D. & Almería, S. 2004b. *J. Vet. Med. S.B* 51:348-52.
- López-Gatius, F., Almería, S., Donofrio, G., Nogareda, C., García-Ispuerto, I., Bech-Sàbat, G., Santolaria, P., Yániz, J.L., Pabón, M., de Sousa, N.M. & Beckers, J.F. 2007a. *Theriogen.* 68:1067-73.
- López-Gatius, F., Garbayo, J.M., Santolaria, P., Yániz, J., Ayad, A., de Sousa, N.M. & Beckers, J.F. 2007b. *Dom. Anim. Endocrinol.* 32:29-42.
- López-Gatius, F., Garbayo, J.M., Santolaria, P., Yániz, J.L., Almería, S., Ayad, A., de Sousa, N.M. & Beckers, J.F. 2007c. *Theriogen.* 67:502-8.
- López-Gatius, F., Hunter, R.H.F., Garbayo, J.M., Santolaria, P., Yániz, J., Serrano, B., Ayad, A., de Sousa, N.M. & Beckers, J.F. 2007d. *Theriogen.* 67:1324-1330.
- Roberston, S.A. 2000. *Rev. Reprod.* 5:164-4.
- Williams, D.J.L. & Trees, A.J. 2006. *Parasite Immunol.* 28:61-7.
- Wilczyński, J.R. 2005. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Immunol.* 122:136-43.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por las ayudas CICYT, AGL2007-65521-C02-01/GAN y AGL2007-65521-C02-02/GAN. Bech-Sàbat fue financiado por la beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia, AP-2005-5378.

INTERACTIONS BETWEEN GAMMA INTERFERON (IFN- γ) PRODUCTION AND PLASMA LEVELS OF PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN-1 (PAG-1) AND IgG1 AND IgG2 ANTIBODY RESPONSES DURING GESTATION IN DAIRY COWS NATURALLY INFECTED WITH *Neospora caninum*

ABSTRACT: Gamma interferon (IFN- γ) production protects cows infected with *Neospora caninum* against abortion. The present study analyzes interactions between IFN- γ production and levels of plasma pregnancy-associated glycoproteins-1 (PAG-1) and IgG1 and IgG2 throughout gestation in *Neospora*-infected dairy cows. Plasma collected throughout gestation or until abortion was tested for antibodies against *N. caninum*, IgG1 and IgG2 isotypes, PAG-1 and IFN- γ . GLM repeated measures analysis revealed that non-aborting *Neospora*-seronegative and -seropositive dairy cows (n=62) showing no IFN- γ production exhibited higher (P=0.04) PAG-1 concentrations than seropositive cows producing IFN- γ (n=14). Non-aborting seropositive cows producing IFN- γ (n=10) showed higher (P=0.01) IgG2/IgG1 ratio than cows not producing IFN- γ (n=11). A negative (P=0.027) effect of IFN- γ production on IgG1 was also observed, while IFN- γ production did not affect IgG2 levels. In contrast, higher levels of IgG2 than IgG1 antibodies were observed in aborting seropositive animals (n=10), both in those producing and not producing IFN- γ . Our data indicate that in *Neospora*-infected dairy cows, the production of IFN- γ correlates negatively and the production of antibodies is uncorrelated with plasma PAG-1 concentrations during gestation and that a Th1 cellular immune response, in which IgG2 antibodies prevail, could be protective against *N. caninum* abortion, but only in cows producing IFN- γ .

Keywords: Dairy cows, *Neospora caninum*, pregnancy associated glycoproteins, gamma interferon, IgG1-IgG2 serotypes.

Nutrición-Alimentación

ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO EN AZÚCARES (SACAROSA, ESTAQUIOSA Y RAFINOSA) DE LA HARINA DE SOJA SEGÚN PROCEDENCIA

González, M.¹, Hermida, M.¹, Sueiro, S.¹, Serrano, M.P.² y Mateos, G.G.²

¹Laboratorio de Mouriscade, Vilanova-Lalín. 36515 Pontevedra. gonzalo.gmateos@upm.es.

²Departamento de Producción Animal, UPM, Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid.

INTRODUCCIÓN

Las habas de soja contienen entre 12 y 17% de azúcares solubles totales de los cuales más del 95% están constituidos por sacarosa (3-9%), estaquiosa (0,6-5,8%) y rafinosa (0,1 a 0,8%) (De Coca-Sinova *et al.*, 2008; Giannoccaro *et al.*, 2008). Estudios previos realizados en nuestro Departamento (Sueiro *et al.*, 2008) muestran una alta variabilidad en cuanto al contenido en azúcares de las harinas de soja (HS) comercializadas en España. De hecho en este estudio, el contenido en sacarosa fue inferior en las HS de origen brasileño que en las de Estados Unidos y lo contrario ocurrió con el contenido en estaquiosa. La digestibilidad de la sacarosa contenida en las HS es alta en aves (Coon *et al.*, 1990) pero los oligosacáridos no son digeridos debido a la ausencia de la enzima α -1,6-galactosidasa en la mucosa intestinal. Por ello, una vez consumidos llegan al colon donde son fermentados por las bacterias intestinales produciendo gases responsables de la flatulencia, azúcares solubles y de la multiplicación desordenada de los microorganismos intestinales. Sin embargo, en formulación práctica, el contenido en azúcares solubles no se tiene en cuenta, lo que puede acarrear problemas en la evaluación del contenido energético de las HS y en la incidencia de camas húmedas en aves (Mateos *et al.*, 2002; De Coca-Sinova *et al.*, 2008).

Existen varios métodos para determinar azúcares en las HS incluyendo la cromatografía de gases con derivatización de la muestra (Knudsen y Li, 1991; Nils-Gunnar *et al.*, 1992), la utilización de enzimas (Giannoccaro *et al.*, 2008) que presentan el problema de no diferenciar estaquiosa y rafinosa y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Ekwall *et al.*, 2007). Todas ellas precisan estandarizar y optimizar las condiciones del método y especialmente del proceso de extracción (tiempo, temperatura y naturaleza del disolvente) del azúcar objeto de estudio.

El objetivo de este ensayo fue evaluar el contenido en sacarosa, estaquiosa y rafinosa de 36 muestras de HS recolectadas en 2008, en función del origen, mediante un método propio validado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 muestras de HS de 3 orígenes diferentes (12 Argentinas, ARG; 12 Brasileñas, BRA y 12 de Estados Unidos, USA) recogidas en el país de origen o en puerto Europeo durante 2008. Las muestras se molieron a 1 mm y posteriormente se realizó la extracción y purificación de los azúcares para su posterior cuantificación mediante HPLC. Para ello, se pesó 1 g de muestra en un erlenmeyer de 100 mL y se añadieron 50 mL de agua. Para la extracción se agitó la mezcla durante 1h a 50 °C. Posteriormente se enfrió hasta temperatura ambiente y se transfirió el líquido a un tubo de centrifuga (4.000 rpm, 15 min). Se recogió una alícuota de 2 mL del sobrenadante que se llevó a un volumen de 10 mL con agua. Esta solución se purificó (cartucho Sep-Pack C₁₈) siguiendo el siguiente protocolo: a) acondicionamiento del cartucho con 5 mL de metanol y 5 mL de agua, b) paso de la muestra (descartando los 2-3 primeros mL) a un vial para su posterior análisis por HPLC y finalmente paso de la muestra a través de unos filtros de 0,45 μ m (GHP) previo al análisis por HPLC. Las muestras (10 μ L) se analizaron utilizando un sistema de HPLC equipado con un desgasificador, una bomba (Waters 1525), un automuestreador (Waters 717 plus) y un detector de índice de refracción (Waters 2414) a 40°C y se separaron a través de una columna Sugar-Pak I (300 mm x 6,5 mm I.D.) empleando como fase móvil agua con

20 mg/L de acetato cálcico y 50 mg/L de EDTA cálcico con un flujo de 0,5 mL/min a 90°C. El porcentaje de azúcares de la muestra se calculó integrando las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas y comparando estas áreas con las de los picos obtenidos con los patrones comerciales (Scharlau No.SA0021 para la sacarosa, Sigma-Aldrich No.851787 para la estaquiosa y Sigma-Aldrich No.R0250 para la rafinosa). Las curvas de calibración se construyeron a partir de los patrones comerciales dentro del rango óptimo de concentración (200-600 mg/L para la sacarosa, 100-300 mg/L para la estaquiosa y 25-100 mg/mL para la rafinosa). El coeficiente de correlación para todas ellas fue de 0,999. Previo al análisis, todas las soluciones de los patrones se hicieron pasar a través de filtros de 0,45 µm.

Los resultados se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 1990) para diseños al azar. El modelo incluyó el origen de la HS como efecto principal. Para la separación de medias se llevó a cabo un t-test. Los datos se presentan en tablas (% materia seca, MS) como medias normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores químicos de las 36 HS analizadas estuvieron dentro del rango esperado para HS altas en proteína (54,0, 52,3 y 54,2%MS de proteína y 3,35, 3,26 y 3,16%MS de lisina para USA, ARG y BRA, respectivamente). Asimismo la actividad de los inhibidores de la tripsina fue de 4,1, 2,9 y 3,3 mg/g para USA, ARG y BRA, respectivamente. Las HS de origen USA tuvieron más estaquiosa que las procedentes de ARG y BRA (6,70 vs. 5,74 y 5,50% MS; $P < 0,001$) (Tabla 1). Asimismo, las HS procedentes de USA tuvieron más sacarosa y menos rafinosa que las sojas BRA, presentando las sojas ARG valores intermedios ($P < 0,001$). Los resultados obtenidos pueden ayudar a explicar diferencias en resultados productivos entre pollos alimentados con diferentes partidas de HS. Una diferencia de 3 a 4 puntos en el contenido en sacarosa, que en base a este trabajo es bastante frecuente, puede suponer sub-valorar en más de 100 kcal el contenido en EMAn de la HS utilizada (más de un 4% de su valor energético). Asimismo, diferencias en el contenido de oligosacáridos de 2 a 3 puntos son frecuentes, lo que puede afectar a la aparición de problemas de heces pastosas.

Se concluye que el contenido en sacarosa y, por tanto, el contenido en EMAn de las sojas varían entre orígenes y entre muestras dentro de un origen. Asimismo, el contenido en estaquiosa y rafinosa varía con estos factores lo que debe tenerse en cuenta en formulación práctica. Por tanto, las fábricas de pienso deberían analizar las partidas de HS recibidas por el contenido en estos azúcares y modificar las matrices de formulación acorde a estos valores.

Tabla 1. Influencia del origen de la harina de soja sobre el contenido en azúcares (% MS)

<i>Origen</i>	<i>Estaquiosa</i>	<i>Rafinosa</i>	<i>Sacarosa</i>
USA	6,70 ^a	1,13 ^c	8,17 ^a
Argentina	5,74 ^b	1,34 ^b	7,70 ^b
Brasil	5,50 ^b	1,55 ^a	6,93 ^c
e.e. (n = 12)	0,108	0,0544	0,161
Probabilidad	***	***	***

***. $P < 0,001$. ^{a-c} Valores de la misma columna con diferente superíndice son diferentes ($P < 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coon, C. N., Leske, K. L., Akavanichan, O. y Cheng, T. K. 1990. *Poult. Sci.* 69: 787-793. • De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 2613-2623. • Ekwall, J., Stegmark, R. y Nyman, M. 2007. *J. Food Composition Anal.* 20: 13-18. • Giannoccaro, E., Jane, Y. y Chen, P. 2008. *Food Chem.* 106: 324-330. • Knudsen, E. B. y Li, B. W. 1991. *J. Agric. Food Chem.* 39: 689-694. • Mateos, G. G., Lázaro, R. y Gracia, M. I. 2002. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 437-452. • Nils-Gunnar, C., Hasse, K. y Sandberg, A. S. 1992. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2404-2412. • Statistical Analysis Systems Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, USA. • Sueiro, S., Hermida, M., Valencia, D. G., Serrano, M. P. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 29 (abstr.).

A COMPARATIVE STUDY ON THE SUGAR (SACCHAROSE, STACHYOSE AND RAFFINOSE) CONTENT OF SOYBEAN MEAL ACCORDING TO ORIGIN

ABSTRACT: A trial was conducted to determine the content of saccharose (SAC), stachyose (STA), and raffinose (RAF) of 36 samples of soybean meal (SBM) obtained from 3 different countries; USA, Argentine (ARG), and Brazil (BRA). The sugars were analysed by high performance liquid chromatography using 50 ml of water/g of sample and a temperature of 50°C for 1 h. The SAC content varied among countries ($P < 0.001$) being higher for USA than for BRA, with ARG content being intermediate. Also, USA SBM had more stachyose and less raffinose than BRA SBM, with ARG being intermediate ($P < 0.001$). It is known that the SAC contained in SBM are well digested by poultry and thus, the AMEn content of a batch of SBM will depend on its SAC content. It is concluded that feed mills should analyze incoming batches SBM for sugars because of its high variable content that might influence metabolizable energy content (saccharose level) and the incidence of flatulence, digestive discomfort, and wet litter (stachyose and raffinose level).

Keywords: soybean meal origin; saccharose; stachyose; raffinose.

INFLUENCIA DEL ORIGEN DE LA HARINA DE SOJA SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA, EL VALOR NUTRICIONAL Y LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA

Mateos, G.G.¹, Sueiro, S.², Rebollar, P.G.¹, Serrano, M.P.¹, González, M.² y Lázaro, R.¹

¹Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid.
gonzalo.gmateos@upm.es. ²Laboratorio de Mouriscade, Vilanova-Lalín. 36515, Pontevedra.

INTRODUCCIÓN

La harina de soja (HS) es el ingrediente más utilizado en alimentación animal como fuente de proteína bruta (PB) y la lisina de los piensos (Mateos *et al.*, 2002). La mayor parte de las tablas de composición de alimentos (NRC, 1998; Fedna, 2003) consideran dos tipos de HS en función de su contenido en PB sin tener en cuenta ni el origen ni las condiciones del procesado. Sin embargo, estudios recientes (Grieshop *et al.*, 2003; De Coca *et al.*, 2008; Valencia *et al.*, 2008) indican que el valor nutricional y la calidad de la proteína de las HS pueden variar con el origen. El presente ensayo tuvo como objetivo estudiar la composición química, el valor nutricional y la calidad de la PB valorada en laboratorio de HS procedentes de tres países diferentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron un total de 262 muestras de HS procedentes de Argentina (ARG, n = 77), Brasil (BRA, n = 51) y la Costa Este de Estados Unidos (USA, n = 134), durante los años 2007 y 2008. Las muestras fueron recolectadas, bien en el país de origen bien a llegada a puerto Europeo, y se analizaron los nutrientes principales, azúcares, minerales y los parámetros de calidad de la PB (actividad de los inhibidores de la tripsina, AIT; índice de dispersabilidad de la proteína, PDI; solubilidad en KOH, KOH sol. y actividad ureasa). Las técnicas analíticas se detallan en los trabajos de De Coca *et al.* (2008) y en las normas AOAC International (2000). Además, se determinaron los aminoácidos (AA) mediante tecnología NIR (Evonik, Hanau, Alemania) según Fontaine *et al.* (2001). Los resultados se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 1990) para diseños al azar. El modelo incluyó el origen de la HS como efecto principal. Para la separación de medias se llevó a cabo un t-test. Los datos se presentan en tablas (% materia seca, MS) como medias normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El origen de la HS influyó sobre la mayoría de los parámetros analíticos determinados (Tabla 1). Así, el contenido en PB fue mayor para la HS USA que para la ARG, presentando la BRA valores intermedios (54,3 vs 52,0 vs 52,9%; $P < 0,001$). Asimismo, el contenido en fibra neutro detergente varió entre orígenes (8,7 vs 10,6 vs 11,8% para USA, ARG y BRA, respectivamente; $P < 0,001$). Las HS BRA tuvieron menos sacarosa (6,8 vs 7,6 y 7,3%) que las ARG y USA ($P < 0,01$). Por contra, las HS USA contenían más estaquiosa que las otras 2 (6,4 vs 5,7 y 5,4% para USA, ARG y BRA, respectivamente; $P < 0,001$). Las HS ARG y USA tuvieron mayor contenido en potasio (K, 2,57 y 2,54 vs 2,17%; $P < 0,001$) y fósforo (P, 0,76 y 0,79 vs 0,68%; $P < 0,001$) y menor en hierro (119 y 129 vs 193 mg/kg; $P < 0,01$) que las BRA. Asimismo, el origen influyó sobre los parámetros de la calidad de la PB. Las HS USA tuvieron mayor AIT que las ARG y BRA (3,9 vs 3,0 y 3,0 mg/g, respectivamente; $P < 0,001$) y la solubilidad de la PB fue superior para las HS USA que para las HS de origen Sudamericano (PDI = 19,8, 16,8 y 15,1% y KOH sol. = 87,5, 81,8 y 84,9% para USA, ARG y BRA, respectivamente; $P < 0,001$). Se observó una correlación positiva entre el valor de AIT y los parámetros de calidad ($r = 38,9\%$ para ureasa, 72,0% para KOH sol. y 69,4% para PDI; $P < 0,001$).

Tabla 1. Influencia del origen sobre la composición química y la calidad de la proteína de la harina de soja (% MS)

Origen	ARG	BRA	USA	e.e.	P
<i>Composición química</i>					
PB	52,0 ^c	52,9 ^b	54,3 ^a	0,10	***
EE	2,1 ^a	2,2 ^a	1,8 ^b	0,03	***
FB	5,1 ^b	5,9 ^a	4,2 ^c	0,06	***
FND	10,6 ^b	11,8 ^a	8,7 ^c	0,10	***
Sacarosa	7,6 ^a	6,8 ^b	7,3 ^a	0,07	**
Estaquiosa	5,7 ^b	5,4 ^b	6,4 ^a	0,06	***
Rafinosa	1,4 ^b	1,5 ^a	1,3 ^b	0,02	***
Potasio	2,57 ^a	2,17 ^b	2,54 ^a	0,02	***
Fósforo	0,76 ^b	0,68 ^c	0,79 ^a	0,003	***
Hierro, mg/kg	119 ^b	193 ^a	129 ^b	5,9	**
<i>Calidad de la proteína</i>					
AIT, mg/g ¹	3,0 ^b	3,0 ^b	3,9 ^a	0,05	***
PDI, %	16,8 ^b	15,1 ^c	19,8 ^a	0,27	***
KOH sol., %	81,8 ^c	84,9 ^b	87,5 ^a	0,22	***
Ureasa, gN/g	0,02	0,03	0,02	0,002	NS

¹ Actividad de los inhibidores de la tripsina. NS: $P > 0,10$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$. ^{a-c} Valores de la misma fila con diferente superíndice son diferentes ($P < 0,05$).

El perfil en AA varió con el origen de la HS. Así, contenido en lys (3,34 vs 3,14 vs 3,21%), met + cys (1,56 vs 1,47 vs 1,52%) y thr (2,12 vs 2,04 vs 2,07%) fue superior para las HS USA que para las BRA con las ARG en una posición intermedia (Tabla 2).

De hecho, la suma de los 5 AA más limitantes en avicultura (lisina, metionina, cistina, treonina y triptófano) fue superior para la HS USA que para las otras dos (7,77 vs 7,53 y 7,36% para USA, ARG y BRA, respectivamente; $P < 0,001$).

Tabla 2. Influencia del origen sobre el perfil de aminoácidos de la harina de soja (%MS)

Origen	ARG	BRA	USA	EEM	P
Lisina	3,21 ^b	3,14 ^c	3,34 ^a	0,0070	***
Metionina	0,72 ^b	0,70 ^c	0,74 ^a	0,0010	***
Cistina	0,80 ^b	0,77 ^c	0,82 ^a	0,0017	***
Treonina	2,07 ^b	2,04 ^c	2,12 ^a	0,0031	***
Triptófano	0,72 ^b	0,71 ^c	0,74 ^a	0,0011	***
Limitantes ¹	7,53 ^b	7,36 ^c	7,77 ^a	0,011	***

¹ Lisina, metionina, cistina, treonina y triptófano. ***: $P < 0,001$. ^{a-c} Valores de la misma fila con diferente superíndice son diferentes ($P < 0,05$).

Se concluye que el perfil nutricional (contenido en PB, perfil de AA y contenido en sacarosa y P) es mejor para las HS de origen USA que para las procedentes de ARG o de BRA. Por tanto, las instituciones y los fabricantes de pienso deberían utilizar distintas matrices de composición de las HS en función el origen de las mismas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Association of Official Analytical Chemists International. 2000. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 17ª edición. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 2613-2623.
- Fontaine, J., Hörr, J. y Schirmer, B. 2001. *J. Agric. Chem.* 49: 57-66.
- Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal. 2003. En: De Blas, C., Mateos, G. G. y Rebollar, P. G. (Eds.), *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*. 2ª edición. FEDNA, Madrid, España.
- Grieshop, C. M., Kadzere, C. T., Clapper, G. M., Frazier, R. L. y Fahey Jr., G.C. 2003. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7684-7691.
- Mateos, G. G., Lázaro, R. y Gracia, M. I. 2002. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 437-452.
- NRC. 1998. En: *Nutrient requirements of swine*. 10ª edición. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Statistical Analysis Systems Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, USA.
- Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R., Latorre, M. A. y Mateos, G. G. 2008. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 340-356.

INFLUENCE OF ORIGIN ON THE NUTRITIONAL VALUE AND PROTEIN QUALITY OF SOYBEAN MEALS

ABSTRACT: A total of 262 samples of soybean meal (SBM) from Argentina (ARG, 77), Brazil (BRA, 51) and USA (134) were collected and analyzed for all nutrients including amino acids and protein quality control. On dry matter bases, SBM from USA had more CP (54.3 vs 52.0 vs 52.9 %; $P < 0.001$), and less NDF (8.7 vs 10.6 vs 11.8%; $P < 0.001$) than SBM from ARG and BRA. Saccharose and stachyose content were higher for USA and ARG meal than for BRA meal ($P < 0.001$). Also, the P and K content were higher ($P < 0.001$) and the Fe content was lower ($P < 0.01$) for ARG and USA meals than for BRA meal. The PDI, the KOH sol. and the trypsin inhibitor activity were higher for USA than for ARG or BRA ($P < 0.001$). In addition SBM from USA had more lys, met + cys, and thr than SBM from BRA with SBM from ARG being intermediate ($P < 0.001$). It is concluded that the chemical analyses of nutrient content and quality of the protein fraction favor the nutritive value of the SBM of USA origin with respect to the other meals.

Keywords: soybean meal origin; protein quality; nutritional value.

ESTUDIO PRELIMINAR PARA IDENTIFICAR EL ORIGEN DE LAS HARINAS DE SOJA MEDIANTE TECNOLOGÍA NIRS Y MEDICIÓN DEL COLOR

Núñez-Romero, N., García-Rebollar, P., Lázaro, R., Serrano, M.P. y Mateos, G.G.
Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid.
paloma.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

La composición química y el valor nutritivo de las harinas de soja (HS) varían con las condiciones de cultivo y los procesos utilizados para su obtención entre países de origen (Thakur y Hurburgh, 2007; De Coca-Sinova *et al.*, 2008). Sueiro *et al.* (2008) han observado diferencias analíticas muy significativas entre HS obtenidas de Estados Unidos (USA), Brasil (BRA) y Argentina (ARG), en especial en lo referente al perfil de aminoácidos y el contenido en azúcares y minerales. Por ello, el conocimiento del país de origen puede ayudar a mejorar la tipificación de las HS comerciales. La tecnología NIRS ha demostrado ser un potente sensor para la identificación de numerosos productos agroalimentarios, con la ventaja adicional de no precisar la aplicación de ningún método previo de preparación de las muestras (Garrido-Varo *et al.*, 2003). Algunas propiedades físicas de las HS de fácil medición, tal como el color, podrían estar relacionadas con la intensidad del tratamiento térmico recibido y con el valor nutricional de la harina (McNaughton *et al.*, 1981). El objetivo de este trabajo fue realizar una evaluación preliminar del potencial de estos métodos rápidos para identificar el país de origen de las HS utilizadas comúnmente en el mercado español.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 117 muestras de HS fueron recogidas de 3 países diferentes e identificadas por el puerto de procedencia: ARG (n=54), BRA (n=39) y USA (n=23). Todas las muestras fueron analizadas utilizando un espectrofotómetro Foss NIRSystem 5000, sin ningún tratamiento previo de preparación. Los datos espectrales se registraron como log 1/R en el intervalo entre 1100 a 2500 nm. Cada muestra se dividió en dos submuestras, utilizando el espectro medio para el análisis estadístico. Simultáneamente a las lecturas con el NIRS, se determinó por triplicado el color de cada submuestra sobre la superficie de la ventana de cuarzo de las cápsulas, utilizando un colorímetro Minolta (modelo CR-300). El color fue expresado por las coordenadas del sistema CIELAB (L^* , a^* , b^*) y en el análisis estadístico se utilizaron los valores medios de cada parámetro para las 6 mediciones por muestra.

Para desarrollar los modelos de clasificación NIRS, los 3 grupos de HS por país de procedencia se dividieron al azar en dos colectivos, uno de calibración (n=102 muestras) para desarrollar los modelos y otro de validación externa (n=12) con muestras no incluidas en las calibraciones (Tabla 1). Para el tratamiento estadístico de la información espectral se desarrollaron diferentes modelos utilizando el análisis discriminante del software WinISI II v.1.5 con el algoritmo PLS2. En todos los modelos se utilizaron 4 grupos de validación cruzada combinando diferentes estrategias para el pretratamiento de los datos espectrales: sin corrección (0,0,1,1), SNV+Detrend (0,0,1,1), SNV+D (1,5,5,1) y SNV+D (2,5,5,1). El mejor modelo fue seleccionado en base al menor error estándar (SECV) y el mayor coeficiente de determinación (r^2) en validación cruzada. Los resultados de la validación externa se evaluaron por el porcentaje de muestras correctamente clasificadas globalmente y para cada país de procedencia de las harinas (Fernández-Ibañez *et al.*, 2009).

Tabla 1. Número de muestras de harinas de soja de cada origen en los colectivos de calibración y validación externa para el desarrollo de los modelos discriminantes

	Calibración	Validación
Argentina	49	6
Brasil	33	6
USA	20	3

Los resultados de color se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (1990) para diseños al azar, con el país de origen de la HS como efecto principal del modelo. Para la separación de medias se llevó a cabo un t-test y los datos se presentan como medias corregidas por mínimos cuadrados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mejor modelo de clasificación del origen de las HS ($SECV= 0.282$, $r^2_{CV}=0.605$) fue obtenido con el tratamiento de la señal espectral (2,5,5,1). La Tabla 2 muestra los resultados de validación cruzada del análisis discriminante realizado sobre datos espectrales de estas harinas. El número que aparece en la diagonal corresponde a las muestras del colectivo de calibración correctamente clasificadas por el modelo según su país de origen, mientras que los situados fuera de la diagonal indican muestras erróneamente clasificadas. El error global de clasificación del modelo fue muy bajo (8,03%), y afectó principalmente a las muestras de USA, probablemente por encontrarse insuficientemente representadas en el modelo desarrollado respecto a los otros dos orígenes (Pérez-Marín *et al.*, 2006). En la Figura 1 se representa la proyección de las muestras en el espacio tridimensional formado por los 3 primeros factores, donde es posible apreciar una separación bastante clara entre países de procedencia de las harinas.

Tabla 2. Número de muestras de harinas de soja clasificadas correctamente por país de origen en validación cruzada

Origen	Argentina	Brasil	USA	% Aciertos
Argentina	47	2	0	95,9
Brasil	1	32	0	97,0
USA	2	3	15	75,0

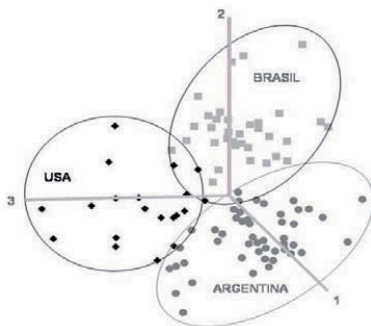


Figura 1. Representación 3D de los scores del colectivo de muestras de calibración del modelo discriminante para los 3 primeros factores PLS.

Los resultados de la validación externa obtenidos con un colectivo de muestras no incluidas en el modelo figuran en la Tabla 3. Todas las muestras fueron encuadradas en sus correspondientes categorías excepto una muestra de ARG, por lo que el porcentaje global de muestras clasificadas erróneamente (6,67%) resultó similar al obtenido en validación cruzada.

Tabla 3. Número de muestras de harinas de soja clasificadas correctamente por país de origen en validación externa

Origen	Argentina	Brasil	USA	% Aciertos
Argentina	5	1	0	83.3
Brasil	0	6	0	100
USA	0	0	3	100

El origen de las HS influyó significativamente ($P < 0,01$) sobre los parámetros que definen el color, excepto en la luminosidad (Tabla 4). Las HS de BRA presentaron intensidades de rojos más altas que las de ARG y USA, y las HS de USA tuvieron tonalidades amarillas más intensas que las de origen Sudamericano.

Tabla 4. Influencia del origen sobre el color de las harinas de soja

	Argentina	Brasil	USA	e.e.	P
L* (luminosidad)	67.9	68.1	68.7	0.475	0.569
a* (+a*=rojo, -a*=verde)	5.32a	6.05b	5.24a	0.188	0.0025
b* (+b*=amarillo, -b*=azul)	21.6a	20.8b	22.4c	0.220	0.0001

Los resultados obtenidos en este trabajo han de ser corroborados con el desarrollo de modelos generados con un mayor número de muestras, pero la tecnología NIRS parece ser una herramienta eficaz para identificar el origen de las HS. El análisis NIRS presenta claras ventajas frente a otras técnicas rápidas (p.e., color) porque los datos espectrales engloban la información de todas las propiedades físico-químicas de las muestras, y hace posible su implantación real en el control de recepción de fábricas de piensos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 2613-2623.
- Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A. y de la Roza-Delgado, B. 2009. *Food Chem.* 113: 629-634
- Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, J.E., Guerrero, J.E. y Gómez-Cabrera, A. 2003. En: *XIX Curso de Especialización FEDNA*, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid, pp: 3-26
- McNaughton, J.L., Reece, F.N. y Deaton, J.N. 1981. *Poultry Sci.* 60:393-400.
- Pérez-Marín, D.C., Garrido-Varo, A. y Guerrero, J.E. 2006. *Applied Spectr.* 60:1432-1437. Statistical Analysis Systems Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, USA.
- Sueiro, S., Hermida, M., Valencia, D.G., Serrano, M.P. y Mateos, G.G. 2008. *Poult. Sci.* 87:29 (Abstr.)
- Thakur, M. y Hurburgh, C.R., 2007. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84:835-843. WinISI II software v.1.5. (2000) Port Matilda, PA, USA: Infrasoft International.

PRELIMINARY ASSESSMENT FOR ORIGIN IDENTIFICATION OF SOYBEAN MEALS BY NIRS AND COLOUR

ABSTRACT: The aim of this work was to investigate the potential of near infrared spectroscopy (NIRS) and colour (CIELAB system) for discrimination among soybean meals (SBM) from different geographical origins (Argentina, Brazil and USA). A total of 102 samples were involved to develop models using PLS2-discriminant analysis on spectral data for intact SBM, and 15 samples were randomly selected from different origins for external validation. The best predictive model, using a second derivative data pre-treatment and full cross-validation, correctly classified 92% of training samples by their origin. The classification value of the model was 93% using the validation set of samples. Colour of the total set of SBM samples differs among origins, being the redness of the Brazilian meals higher than Argentinian and USA meals. The yellowness of the USA meals was higher than the Sudamerican meals. These results show that NIRS technology can be used as a quick method for predicting the origin of soybean meals. This methodology can be easily implemented in the quality control of the feed mill industry.

Keywords: soybean meal, origin, colour, NIRS.

CONTENIDO EN INHIBIDORES DE TRIPSINA DE LA HARINA DE SOJA SEGÚN ORIGEN: COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Sueiro, S.¹, Hermida, M.¹, González, M.¹, Serrano, M.P.² y Mateos, G.G.²

¹Laboratorio de Mouriscade, Vilanova-Lalín. 36515 Pontevedra. gonzalo.gmateos@upm.es.

²Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid.

INTRODUCCIÓN

La harina de soja (HS) es una fuente de proteína vegetal extensamente empleada en la alimentación animal. Las habas de soja presentan altos niveles de factores antinutricionales que se reducen mediante procesado térmico. Los factores antinutricionales más importantes del haba son los inhibidores de tripsina (IT) que reducen la digestibilidad de la proteína bruta (PB) y de los aminoácidos (De Coca *et al.*, 2008; Valencia *et al.*, 2008). La calidad de la HS varía en función del procesado térmico al que ha sido sometida. Un procesado insuficiente no desnaturaliza suficientemente los IT por lo que la digestibilidad de la PB se verá reducida. Por el contrario, un sobre-procesamiento disminuye el contenido en IT pero también la biodisponibilidad de algunos aminoácidos. Mateos *et al.* (2002) indicaron que niveles altos de IT en el pienso son una de las causas más relevantes de problemas entéricos en pollos de carne. La determinación de la actividad de los IT (AIT) es el método más preciso para determinar la calidad de la HS, pero requiere un alto nivel de especialización en laboratorio. Los dos métodos más utilizados por la industria para la determinación de IT son el método 14902:2001 de las Normas UNE-EN-ISO (2002) y el método 71-10 de la AACC (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981). Ambos métodos tienen complicaciones laboratoriales, son tediosos de realizar y suponen un coste elevado. En este estudio se analizaron muestras de HS de tres orígenes (Estados Unidos, USA; Argentina, ARG; Brasil, BRA) mediante estos dos métodos para evaluar posibles diferencias en función del origen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 150 muestras de HS (50 de cada origen) recogidas en tres años (2006 a 2008). Los métodos utilizados para determinar la AIT fueron el método 14902:2001 de las Normas UNE-EN-ISO (2002) modificado por nuestro laboratorio y el método 71-10 de la AACC (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981). Ambos métodos se basan en la reacción enzimática de la tripsina con un sustrato; L-BAPA, isómero L purificado para el método UNE-EN-ISO (2002) modificado y DL-BAPA, mezcla de los isómeros D y L para el método AACC (1973) modificado. Brevemente, las modificaciones introducidas en el método UNE-EN-ISO (2002) consistieron en moler la muestra a 0,2 mm en vez de a 0,5 mm y extraer los IT agitando la muestra durante 3 h a temperatura ambiente en vez de 24 h en frigorífico. La razón del cambio radica en que cuanto menor es el tamaño de partícula de molienda y mayor la temperatura y la agitación, mayor será la superficie de contacto y exposición de los IT para su extracción.

Por otro lado, y dado el alto coste del reactivo L-BAPA, con el fin de optimizar costes se realizó un blanco para cada cinco muestras analizadas al mismo tiempo en vez de uno por cada muestra. Tras comprobarse que, para muestras con valores de IT similares, el valor de blanco obtenido no influía en el resultado final, se redujo el consumo de reactivo a la mitad con el consiguiente ahorro económico. Para la determinación de la AIT, se pesó 1 g de muestra molida con tamiz de 0,2 mm. Se añadieron 50 ml de NaOH (ajustando el pH a 9,5) para extraer los IT y se agitó la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente. Una vez extraídos los IT, se efectuó la reacción enzimática entre la tripsina y el sustrato en presencia de IT (37°C durante 10 min y parada mediante la adición de HAC 30%) haciendo reaccionar por un lado la tripsina y los sustratos solos en un tubo de ensayo (tubo A) y por otro lado la enzima y el sustrato (tubo B) en presencia de una cantidad de IT suficiente para generar entre un 60 y un 40% de la inhibición del color que se generó en el tubo A. Finalmente se centrifugaron los dos tubos de ensayo y se midió espectrofotométricamente a 410 nm la

absorbancia de la p-nitroanilina generada en la reacción enzimática. Las medidas espectrofotométricas resultantes junto con el factor de dilución del extracto inicial de la muestra se relacionaron con la concentración de IT. El resultado final se expresa como AIT (mg de tripsina inhibidos por g de muestra de HS en materia seca). Los resultados se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 1990) para diseños al azar organizados de forma factorial. En el modelo se incluyeron los efectos principales (origen de la HS, método de análisis) y su interacción. Para la separación de medias según el origen de la HS se llevó a cabo un t-test. Los datos se presentan en una tabla como medias normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido medio en PB (%MS) de las HS analizadas fue $53,1 \pm 1,60$ ($54,4^a \pm 1,75$ para USA, $52,0^c \pm 1,53$ para ARG y $52,9^b \pm 1,50$ para BRA). Para la lisina el valor medio (%MS) fue $3,2 \pm 0,14$ ($3,3^a \pm 0,050$ para USA, $3,2^b \pm 0,078$ para ARG y $3,2^b \pm 0,19$ para BRA). La interacción entre el origen de la HS y el método de análisis no fue significativa por lo que sólo se presentan las medias para los efectos principales (Tabla 1). Las HS USA tuvieron una mayor AIT que las HS ARG y BRA ($P < 0,001$). Esta variación en el contenido en IT según origen de la HS puede ser debido al tipo de procesado que se realiza en cada país. Un valor bajo en AIT no es indicativo necesariamente de buena calidad de la HS puesto que valores reducidos podrían también indicar que la HS está sobre-procesada. Por ello, es recomendable realizar ensayos sobre la disponibilidad de la lisina (lisina reactiva) en estas muestras.

No se detectaron diferencias significativas en el valor de AIT entre los dos métodos de análisis. Por tanto, ambos métodos pueden ser utilizados sin problema en el laboratorio. Sin embargo, debido a que el coste del reactivo utilizado en el método 14902:2001 de las Normas UNE-EN-ISO (2002) modificado es casi 40 veces mayor que el del reactivo utilizado en la metodología AACC (1973), se recomienda el uso del método AACC (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981).

Tabla 1. Influencia del origen de la harina de soja y del método analítico sobre la actividad de los inhibidores de la tripsina (AIT, mg/g MS)

Origen soja			Método análisis		e.e. n = 50	Probabilidad	
USA	Argentina	Brasil	ISO	AACC		Origen	Método
3,78 ^a ± 1,16	2,93 ^b ± 0,80	3,09 ^b ± 0,76	3,26 ± 0,98	3,27 ± 1,01	0,131	***	NS

NS: $P > 0,10$; ***: $P < 0,001$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. 1973. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Método 71-10. The Association: St. Paul, MN.
- De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 2613-2623.
- Hamerstrand, G. E., Black, L. T. y Glover, J. D. *Cereal Chem.* 58: 42-45, 1981.
- Mateos, G. G., Lázaro, R. y Gracia, M. I. 2002. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 437-452.
- Statistical Analysis Systems Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, USA.
- UNE-EN-ISO. 2002. *Animal Feedingstuffs-Determination of trypsin inhibitor activity of soya products (ISO 14902:2001)*.
- Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R., Latorre, M. A. y Mateos, G. G. 2008. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 340-356.

A COMPARATIVE STUDY ON THE TRYPsin INHIBITOR CONTENT OF SOYBEAN MEAL OF DIFFERENT ORIGINS: INFLUENCE OF THE METHOD OF DETERMINATION

ABSTRACT: An experiment was conducted to study the trypsin inhibitor activity (TIA) of 150 samples of soybean meal (SBM) collected in 3 different countries (USA; Argentine, ARG; Brazil, BRA). In addition, the TIA of all the SBM samples was analyzed according to method 14902:2001 (UNE-EN-ISO, 2002) as modified by our laboratory or to method 71-10 (AACC, 1973) modified by Hamerstrand *et al.* (1981). Briefly, the modifications of the original UNE-EN-ISO (2002) method introduced by us consisted in grinding the sample at 0.2 mm instead of 0.5 mm, using less amount of reactive and extracting the TIA by shaking the mixture of the sample with NaOH for 3 h at ambient temperature instead at 24 h in refrigerator. The modifications introduced allowed to improve the efficacy of the extraction process. The SBM from USA had higher TIA than SBM from ARG and BRA. No differences were detected between TIA method analyses. Thus because of lower cost, AACC (1973) method is recommended.

Keywords: *trypsin inhibitor activity; methodologies; soybean meal; origin.*

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAJE SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA HARINA DE SOJA

Sueiro, S.¹, Frikha, M.², Serrano, M.P.², Hermida, M.¹ y Mateos, G.G.²

¹Laboratorio de Mouriscade, Vilanova-Lalín. 36515, Pontevedra. gonzalo.gmateos@upm.es.

²Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid.

INTRODUCCIÓN

La harina de soja (HS) es la fuente proteica de elección en alimentación animal. De hecho, niveles superiores al 35-40% son utilizados a menudo en aves de carne aportando más de la mitad de la proteína (PB) total de la dieta. La calidad de la HS depende de su origen y de la bondad del proceso de cocción utilizado para destruir los factores antinutricionales que afectan la digestibilidad de los nutrientes. Una cocción severa reduce la concentración de inhibidores de la tripsina (IT) pero aumenta la incidencia de reacciones de Maillard reduciendo la disponibilidad de los aminoácidos y la PB. Por el contrario, un calentamiento excesivamente ligero deja sin destruir gran parte de los IT lo que puede afectar a la integridad de la mucosa digestiva, la incidencia de problemas entéricos y la productividad en pollos (Mateos *et al.*, 2002). Se estima que los valores de IT deben ser inferiores a 4 unidades de IT por mg en muestras de HS adecuadamente procesadas (Clarke y Wiseman, 2007), lo que se corresponde con una actividad de IT (AIT) inferior a 2,1 mg/g. Sin embargo, la determinación de los IT en el laboratorio es tediosa y complicada y conlleva un alto coste económico. Además, esta determinación no da información sobre si la muestra ha sido sobre-procesada. De aquí que la industria utilice métodos laboratoriales más sencillos y baratos para evaluar la bondad del proceso de calentamiento. Los métodos más utilizados por la industria a este particular se basan bien en la destrucción de la ureasa, enzima fácil de determinar que se inactiva con el calor de forma similar a los IT bien en estimar la solubilidad de la PB en agua (índice de dispersibilidad de la PB o PDI) o en KOH (KOH sol.). Los valores aceptados por la industria para estos parámetros en HS bien procesadas son 0,05-0,20 mg N₂/g x min para la actividad ureásica, 15-30% para PDI y 70-85% para KOH sol. (Valencia *et al.*, 2008a). Sin embargo, los resultados de los análisis de PDI y KOH sol. son poco reproducibles observándose una alta variabilidad intra- e inter-laboratorios. Valencia *et al.* (2008b) observaron en HS procedentes de USA valores de PDI inferiores al 15% (9,7%), mientras que los valores de AIT se ajustaban bien a los valores esperados para HS bien procesadas (2,7 mg/g). Por otro lado, De Coca-Sinova *et al.* (2008) encontraron una correlación del 69% (P < 0,01) entre el PDI y la AIT y Sueiro *et al.* (2008) encontraron una correlación del 67% (P < 0,001) entre la AIT y el PDI y del 75% (P < 0,001) entre la AIT y el KOH sol. La razón de esta alta variabilidad en los valores de parámetros utilizados para valorar la calidad de la HS no se conoce pero podría estar relacionada con las condiciones y equipos utilizados en el laboratorio, tal como podría ser el tiempo de almacenaje de la muestra desde su recolección. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia del tiempo de almacenaje sobre los valores de los parámetros de calidad de la PB utilizados por la industria de piensos en 7 muestras de HS recogidas al azar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió la evolución con el tiempo de almacenaje de la actividad ureásica, el PDI, el KOH y la AIT de 7 muestras de HS de origen Argentino recogidas en puerto. El modelo incluyó el tiempo como efecto principal. Las muestras de HS fueron analizadas a la entrada del barco en España y tras 24 y 48 semanas de almacenaje (17 ± 2°C y 70 ± 3% de humedad). La AIT se midió por dos métodos; el método 14902:2001 de las Normas UNE-EN-ISO (2002) y el método 71-10 de la AACC (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981). Los resultados se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 1990) para diseños al azar. La unidad experimental fue la muestra en todos los casos. Para la separación de medias se llevó a cabo un test de Tukey. Los datos se presentan en tablas como medias normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor nutricional de las 7 muestras de HS analizadas en el momento del muestreo inicial (llegada a puerto Español) se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Valor nutricional (%MS) de las 7 muestras de harina de soja analizadas en el momento del muestreo inicial (llegada a puerto Marín, Pontevedra)¹

Muestra	MS	PB	FB	EE
1	87,5	55,0	5,1	0,9
2	87,6	50,2	7,2	1,0
3	87,2	50,2	6,5	1,3
4	87,3	49,8	6,8	1,9
5	86,6	50,5	6,9	3,3
6	88,2	49,1	7,1	2,6
7	87,8	49,0	6,6	2,5

¹MS: materia seca; PB: proteína bruta; FB: fibra bruta; EE: extracto etéreo.

Los valores de la actividad ureásica variaron entre 0,0 y 0,10 mg N₂/g x min lo que indica que algunas de las muestras de HS podrían haber sido sobre-procesadas. Tres muestras presentaron en algún momento del almacenaje valores de PDI inferiores al 15% (una muestra en las tres mediciones; otra muestra a las 24 y 48 semanas de almacenamiento y una tercera muestra a las 48 semanas de almacenamiento). Asimismo, tres de las muestras analizadas presentaron valores de KOH sol. superiores al 85% en alguna de las tres mediciones lo que indica que podrían haber sido infra-procesadas. En 2 de las 7 muestras, el valor de AIT fue superior a 5 UIT/mg en las tres mediciones efectuadas.

El PDI de las muestras de HS se redujo con el tiempo de almacenaje ($P < 0,05$) (Tabla 2). Asimismo, la solubilidad en KOH sol. tendió a disminuir con el almacenamiento ($P < 0,10$). Sin embargo, la AIT fue constante durante este tiempo ($P > 0,05$). Los resultados indican una falta de correlación con el tiempo de almacenaje entre la AIT y los valores de PDI y KOH sol. obtenidos en el laboratorio. Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas entre las Normas UNE-EN-ISO (2002) y las AACC (1973) para la determinación de la AIT (2,48 vs. 2,39 mg/g; $P > 0,10$).

Los resultados de esta prueba indican que los laboratorios de control de calidad de las fábricas de pienso deberían tener en cuenta la duración del almacenaje al valorar el PDI y el KOH sol. de las HS.

Tabla 2. Influencia del tiempo de almacenamiento sobre los parámetros de calidad de la harina de soja

Item	Almacenaje, semanas			e.e. (n = 7)	P
	Muestreo puerto ¹	24	48		
Actividad ureásica, mg N ₂ /gxmin	0,027	0,019	0,023	0,0101	0,84
PDI,%	20,21 ^a	16,46 ^{ab}	14,91 ^b	1,1528	*
Solubilidad KOH, %	85,14	84,20	81,41	1,152	0,09
AIT ISO, mg/g	2,54	2,40	2,49	0,208	0,89
AIT AACC, mg/g	2,40	2,44	2,33	0,211	0,93

¹Junio 2007. ^{a-b} Valores de la misma fila con diferente superíndice son diferentes ($P < 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. 1973. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Método 71-10. The Association: St. Paul, MN. • Clarke, E. J. y Wiseman, J. 2007. *Br. Poult. Sci.* 48: 703-712. • De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 2613-2623. • Hamerstrand, G. E., Black, L. T. y Glover, J. D. 1981. *Cereal Chem.* 58: 42-45. • Mateos, G. G., Lázaro, R. y Gracia, M. I. 2002. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 437-452. • Statistical Analysis Systems Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, USA. • Sueiro, S., Hermida, M., Valencia, D. G., Serrano, M. P. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 29 (abstr.). • UNE-EN-ISO. 2002. *Animal Feedingstuffs-Determination of trypsin inhibitor activity of soya products* (ISO 14902:2001). • Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R., Latorre, M. A. y Mateos, G. G. 2008a. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 340-356. • Valencia, D. G., Serrano, M. P., Centeno, C., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008b. *Livest. Sci.* 118: 1-10.

INFLUENCE OF STORAGE ON PARAMETERS USED TO MEASURE THE QUALITY OF SOYBEAN MEAL

ABSTRACT: An experiment was conducted to determine the effects of length of storage ($17 \pm 2^\circ\text{C}$ and $70 \pm 3\%$ humidity) on the urease, protein dispersibility index (PDI), KOH solubility (KOH sol.) and trypsin inhibitor activity (TIA) of 7 samples of Argentinean soybean meal (SBM). The samples were analyzed at arrival at the port facilities in Marín (Pontevedra, Spain) (June 2007) and at 24 and 48 weeks of storage. The SBM samples were analyzed for TIA following two methods: method 14902:2001 (UNE-EN-ISO, 2002) and method 71-10 (AACC, 1973) as modified by Hamerstrand *et al.* (1981). Length of storage did not affect TIA values or urease activity. However, PDI values decreased (20.2 vs. 16.5 vs. 14.9% for 0, 24, and 48 weeks, respectively; $P < 0.05$) and KOH sol. values tended to decrease (85.14 vs. 84.20 vs. 81.41%; $P < 0.10$) with length of storage. The results indicate that the correlation between TIA and KOH sol. or PDI values varied with length of the storage. Therefore, care should be taken when evaluating the protein quality of SBM in samples that have been stored for prolonged periods of time.

Keywords: *length of storage; soybean meal; protein quality traits.*

UTILIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA INVESTIGAR EL ORIGEN DE HARINAS DE SOJA DE DIFERENTES PAÍSES

García-Rebollar, P.¹, Núñez-Romero, N.¹, Serrano, M.P.¹, Hermida, M.², Lázaro, R.¹ y Mateos, G.G.¹

¹Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid. paloma.grebollar@upm.es. ²Laboratorio Mouriscade. Diputación de Pontevedra. Vilanova-Lalín, 36515 Pontevedra.

INTRODUCCIÓN

Las condiciones ambientales, la variedad genética y las condiciones del procesado aplicadas para la extracción del aceite en los diferentes países productores modifican la composición química de las harinas de soja (HS) y pueden afectar a su valor nutricional (Karr-Lillenthal et al., 2004). El objetivo de este trabajo fue evaluar las relaciones entre composición química e índices de calidad del tratamiento térmico de HS producidas en Argentina (ARG), Brasil (BRA) y Estados Unidos (USA) utilizando el análisis de componentes principales (PC).

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante los años 2007 y 2008 se recogieron un total de 155 muestras de HS, procedentes de los tres principales países exportadores al mercado europeo para maximizar la variabilidad en su composición química. Las muestras fueron identificadas por país de producción y fecha de recogida. Se analizaron los nutrientes principales y parámetros de calidad de la proteína bruta (PB) tales como actividad de los inhibidores de la tripsina (AIT); índice de dispersabilidad de la proteína (PDI); solubilidad en KOH (KOH) y actividad ureasa (AU). Las técnicas analíticas se detallan en De Coca *et al.* (2008) y en las normas AOAC International (2000). Los aminoácidos esenciales (AAE) se determinaron mediante tecnología NIR (Evonik, Hanau, Alemania) según Fontaine *et al.* (2001). Para el tratamiento estadístico de los resultados, expresados en unidades sobre base fresca, se utilizó el análisis de PC del programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de muestras y los parámetros estadísticos utilizados para caracterizar las HS figuran en la Tabla 1. En el análisis de PC se seleccionaron 4 factores (criterio de Kayser) que explican el 84,2% de la variación total observada en la composición y calidad de las HS para las variables analizadas. La primera PC (PC1) representa un 48,9% de la varianza y está asociada positivamente con las variables PB y AAE que definen el contenido proteico de las HS. Las correlaciones más bajas en PC1 corresponden a los AAE presentes en menor proporción en la PB de la HS (Met, Trp y Thr). La segunda PC (PC2) explica un 21,4% de la varianza y está negativamente relacionada con la fibra insoluble (FB y FND) y positivamente con los AAE limitantes en la formulación de piensos para monogástricos (Met, Trp, Thr y Lys). El tercer factor (PC3) agrupa con el mismo signo a todos los índices de calidad del tratamiento térmico y explica un 8,68% de la varianza acumulada. La cuarta PC (PC4) representa solo un 5,17% de la varianza total de la población y está asociada a la materia seca (MS) y materia orgánica (MO) y en menor medida al extracto etéreo (EE) de las HS. Los resultados del análisis de PC, después de la rotación de tipo Varimax, se muestran en la Figura 1. La proporción de la variabilidad total para PB y AAE (Lys, Met, Thr, Trp, Arg, Ile, Leu, Val, His y Phe) explicada por el conjunto de las PC se aproxima a 1 en todos los parámetros. De los índices de calidad del tratamiento térmico, AIT y UIT presentan también proporciones elevadas (0,909 y 0,892, respectivamente), son inferiores para la solubilidad de la PB (KOH, 0,787 y PDI, 0,761) y más bajos para la actividad ureásica (0,529) probablemente debido a otros factores relacionados con la escasa precisión y repetibilidad de estos métodos analíticos. Sólo para el EE la proporción de variabilidad explicada es baja (0,434), lo que puede deberse a la cantidad variable de gomas y otros residuos de la destilación del aceite de soja que se añaden a la HS según las características de cada planta extractora.

La Figura 2 muestra la dispersión de las muestras de HS en el espacio tridimensional de las 3 primeras PC. Si bien estos factores no separan claramente las HS en función del país de origen, los AAE limitantes (Lys, Met, Cys, Thr, Trp), la fibra (FB y FND) y los índices de calidad del tratamiento térmico (AIT, UIT y KOH) contribuyen de forma destacada a diferenciar el país de origen. Para un rango amplio de niveles de PB, las HS de USA tienen mayor contenido en AAE limitantes más elevados que las HS de ARG y BRA, harinas que se caracterizan por sus mayores contenidos en fibra insoluble y menores en inhibidores de tripsina y solubilidad de PB.

Tabla 1. Número de muestras (n), media (X), desviación estándar (SD) y rango (mínimo-máximo) de las variables analizadas por componentes principales.

Variable	ARGENTINA (n=47)			BRASIL (n=38)			USA (n=70)		
	X±SD	Mín.	Máx.	X±SD	Mín.	Máx.	X±SD	Mín.	Máx.
MS	88,8±0,78	87,2	90,6	89,0±0,42	88,1	90,3	88,5±0,55	87,4	90,6
MO	82,0±0,91	78,0	83,6	82,7±0,46	81,6	83,7	81,8±0,79	79,8	84,0
PB	46,7±1,32	43,2	48,8	47,1±1,40	45,6	50,6	47,3±0,88	44,8	49,3
EE	1,90±0,39	0,89	3,39	1,91±0,40	1,11	3,11	1,63±0,47	0,93	2,95
FB	4,27±1,05	3,03	7,42	5,37±0,92	3,45	6,60	3,75±0,42	2,79	5,07
FND	8,96±1,63	6,89	15,5	10,6±1,58	7,50	13,3	7,59±0,86	4,74	11,1
PDI	17,8±4,61	10,4	32,5	15,2±2,29	10,2	21,1	21,9±4,53	13,0	32,2
AU	0,02±0,05	0,00	0,31	0,03±0,04	0,00	0,17	0,02±0,03	0,00	0,13
KOH	81,3±3,18	73,1	89,2	85,7±2,54	80,3	91,2	87,7±3,62	80,8	95,3
AIT	2,69±0,68	1,47	4,60	2,71±0,53	1,90	4,50	3,61±0,73	2,30	5,40
UIT	5,01±1,28	2,44	8,70	5,14±0,89	3,60	8,00	6,49±1,29	4,31	9,40
MET	0,64±0,02	0,60	0,66	0,62±0,01	0,60	0,65	0,66±0,01	0,63	0,69
CYS	0,72±0,02	0,65	0,75	0,69±0,02	0,62	0,71	0,73±0,01	0,70	0,75
LYS	2,85±0,08	2,65	2,97	2,84±0,09	2,76	3,08	2,95±0,04	2,76	3,04
THR	1,84±0,05	1,71	1,91	1,82±0,04	1,77	1,95	1,87±0,03	1,78	1,94
TRP	0,64±0,02	0,60	0,67	0,63±0,02	0,61	0,68	0,66±0,01	0,62	0,67
ARG	3,39±0,11	3,11	3,55	3,45±0,11	3,33	3,72	3,49±0,07	3,27	3,66
ILE	2,13±0,06	1,97	2,24	2,14±0,09	2,07	2,42	2,16±0,04	2,02	2,28
LEU	3,57±0,10	3,30	3,71	3,58±0,13	3,46	3,95	3,63±0,06	3,42	3,75
VAL	2,25±0,07	2,08	2,38	2,24±0,08	2,17	2,48	2,28±0,04	2,16	2,38
HIS	1,27±0,03	1,19	1,32	1,25±0,03	1,21	1,32	1,29±0,02	1,21	1,32
PHE	2,39±0,06	2,23	2,50	2,41±0,08	2,34	2,62	2,42±0,05	2,28	2,52

Los resultados permiten concluir que la variación en la composición y calidad del tratamiento térmico de las HS de los distintos países productores se explica mediante 4 PC, independientes entre sí, definidas por los niveles de PB (PC1), fibra insoluble y AAE limitantes (PC2), calidad de la PB (PC3) y MS y EE (PC4).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Association of Official Analytical Chemists International. 2000. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 17ª edición. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *Poultry Sci.* 87: 2613-2623.
- Fontaine, J., Hörr, J. y Schirmer, B. 2001. *J. Agric. Chem.* 49: 57-66.
- Karr-Lilienthal, L.K., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., Mahan, D.C. y Fahey, G. Jr. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6193-6199.
- Statistical Analysis Systems Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, EEUU.

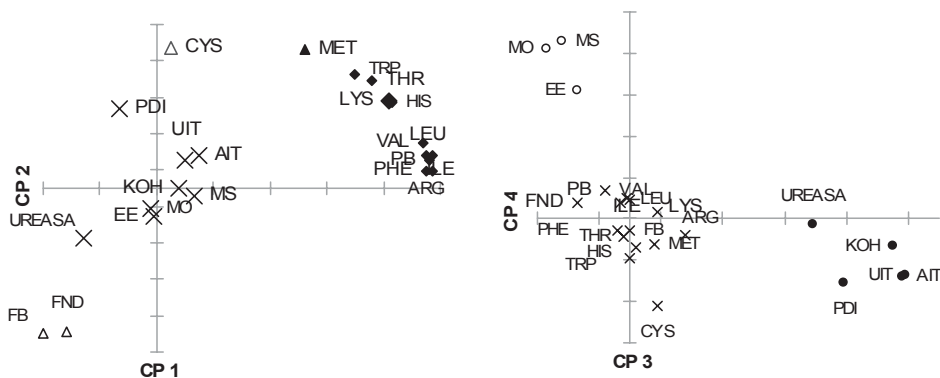


Figura 1. Representación bidimensional de las variables en el plano definido por las CP.

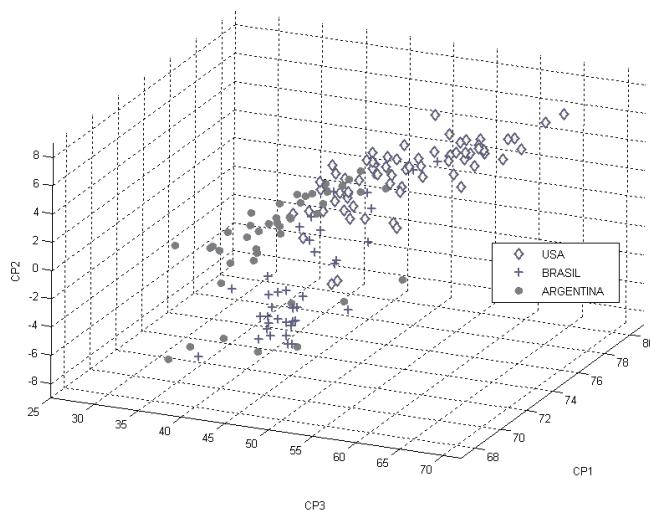


Figura 2. Proyección de las harinas soja por países de procedencia en el espacio definido por las 3 primeras CP.

USE OF PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS TO INVESTIGATE THE ORIGIN OF SOYBEAN MEAL

ABSTRACT: The composition and protein quality of 155 soybean meals (SBM) from different countries, Argentina (ARG), Brazil (BRA) and USA, were determined by analytical methods using 22 variables. Principal component (PC) analysis was carried out in order to illustrate the relationships among them and to distinguish the SBM samples on the basis of their origin. Four PC explained about 84% of total variability: crude protein content define the PC1, insoluble fiber and AAE (Lys, Met, Cys, Thr and Trp) the PC2, trypsin inhibitor activity and protein solubility the CP3, and dry matter and ether extract the PC4. The distribution of the samples on the axis of the first three PCs did not allow a clear identification of the three origins of SBM, but provided useful information about variability of SBM quality between origins.

Keywords: soybean meal, quality, origin, principal component analysis.

RESPUESTA DE LA PROTEÍNA A LA EXTRUSIÓN DE UN PIENSO COMPLETO, EVALUADA POR PRUEBAS DE CRECIMIENTO, BALANCE Y SACRIFICIO CON RATAS

Pérez-Calvo, E.¹, Castrillo, C.¹, Baucells, M.D.² y de la Fuente, G.¹

¹Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. ccastri@unizar.es. ²Grup de Reserca Nutrició, Maneig i Bienestar Animal. Universitat Atónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

El valor proteico de los alimentos para monogástricos está íntimamente relacionado con su contenido en aminoácidos y la disponibilidad de éstos. No obstante, desde principios del siglo XX, se han propuesto numerosos métodos de valoración basados en el estudio de la respuesta, ya sea en términos de crecimiento, o de utilización y retención del nitrógeno determinados por pruebas de balance o de sacrificio, siendo la rata el animal más utilizado. A partir de pruebas de crecimiento puede determinarse la eficiencia con que la proteína es utilizada para promover la ganancia en peso de los animales (PER, razón de eficiencia proteica) o para su mantenimiento y crecimiento conjuntamente (NPR, razón proteica neta). A partir de pruebas de balance entre la ingesta y las excretas de nitrógeno, se puede estimar la digestibilidad de la proteína y su valor biológico (VB), y la utilización proteica neta (UPN) como producto de ambos. La UPN puede ser estimada también mediante pruebas de sacrificio (Miller y Bender, 1955). Aunque todos estos métodos tratan de medir la eficiencia con que es utilizado el nitrógeno de la dieta, cada uno de ellos tiene sus ventajas e inconvenientes metodológicos. Por ejemplo, el incremento de peso y la retención de nitrógeno están estrechamente relacionados, pero la relación puede venir afectada por variaciones en la composición de las ganancias, y la dificultad de la colecta total de heces y excretas en los métodos de balance hace que generalmente se incurra en una sobreestimación del VB y la UPN.

El objetivo de este trabajo fue comparar distintos índices obtenidos mediante pruebas biológicas en ratas, para evaluar la respuesta a proteínas de diferente calidad (caseína frente a la proteína de un pienso convencional para perros formulado con cereales y harina de ave) y la respuesta al efecto de la extrusión del pienso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 ratas Windstar macho de entre 21 y 28 días de edad, con 44,1± 2,79 g de peso vivo, y 4 dietas experimentales: una de ellas libre en proteína (control negativo), y las otras tres con un 10% de proteína bruta (PB), aportada por caseína o un pienso convencional de perros, formulado en base a cereales y harina de ave, sin extrusionar (PNE) o extrusionado (PE). Además de la fuente proteica, las dietas contenían aceite de soja, celulosa, almidón de maíz, sacarosa, vitaminas y minerales en proporciones adecuadas para cubrir sus necesidades (NRC, 1978). Se llevaron a cabo 3 periodos experimentales de 12 días cada uno, utilizando 3 ratas por tratamiento en cada uno de ellos, distribuidas en jaulas metabólicas individuales. Las dietas se ofrecieron *ad libitum* a lo largo de todo el periodo experimental durante el cual se realizaron 2 balances de nitrógeno de forma consecutiva, de 5 días cada uno. En cada uno de los balances se determinó la digestibilidad real (Dr) y el valor biológico real (VBr) de la proteína, y con esos valores se calculó la UPN real media de cada periodo experimental:

$$UPNr = Dr \times VBr = ((NI - (Nh - NMF)) / NI) \times ((NI - (Nh - NMF) - (No - NEU)) / (NI - (Nh - NMF))) = (NI - Nh - No + (NMF + NEU)) / NI = (NR + (NMF + NEU)) / NI,$$

donde, NI, es el nitrógeno ingerido; Nh y No, es el nitrógeno excretado por heces y orina, respectivamente, obtenido mediante colección diaria durante los 2 balances; NMF, es el nitrógeno metabólico fecal calculado como el Nh de las ratas alimentadas con la dieta libre en proteína, corregido por la materia seca ingerida (MSI) de las ratas alimentadas con las dietas problema; NEU, es el nitrógeno endógeno urinario, calculado como el No de las ratas alimentadas con la dieta libre en proteína, corregido por el peso vivo metabólico ($PV^{0,75}$), y NR, representa el nitrógeno retenido por el animal.

Se determinó también el PER y la NPR en cada uno de los periodos experimentales, mediante el pesaje de los animales al inicio y al final de cada periodo:

PER= ganancia de peso vivo /NI

NPR= (ganancia de peso vivo de las ratas alimentadas con las dietas con proteína + pérdida de peso vivo de las ratas alimentadas con la dieta libre de proteína)/NI

Al final de cada periodo experimental los animales fueron sacrificados siguiendo el protocolo de eutanasia recomendado por el Comité Ético de la Universidad de Zaragoza, y se determinó el contenido total en nitrógeno del cuerpo vacío de las ratas, para calcular la UPNr de acuerdo con Miller y Bender (1955):

UPNrs = NA–NB/NI = NR+((NMF+NEU))/NI,

donde, NA es el contenido en nitrógeno total de las ratas alimentadas con las dietas con proteína y NB es el contenido en nitrógeno total de las ratas alimentadas con las dietas sin proteína, corregido por el peso medio inicial de las ratas que recibieron las dietas con proteína.

Los contenidos en materia seca y nitrógeno de las muestras de alimentos, heces, orina y el cuerpo de las ratas se determinaron según los procedimientos de la AOAC (2000). Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza, atendiendo a un diseño en bloques al azar, considerando los periodos como bloques, y la significación estadística de las diferencias entre los valores medios de cada periodo experimental se establecieron mediante el test de Tukey. Se establecieron también relaciones entre los distintos parámetros estudiados. Los análisis de varianza se llevaron a cabo mediante el procedimiento GLM y las relaciones se establecieron mediante el procedimiento REG del programa estadístico SAS (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados medios de valores de PER, NPR y UPN obtenida por el método de balance (UPNr) y por el método de sacrificio (UPNrs), para cada una de las dietas a estudio. Como era de esperar, por tratarse de una proteína de muy alta calidad, todos los índices de valor proteico estudiados fueron significativamente superiores en la dieta con caseína que en las dietas en las que se utilizó pienso de perros como fuente de proteína. La dieta que incluyó el pienso sin extrusionar mostró también mayores valores de PER, NPR y UPNr que la dieta que incluyó el pienso extrusionado (4,2%, 5,4%, y 10,0%, respectivamente), aunque las diferencias sólo fueron significativas en el caso de la UPNr obtenida por el método de balance. Estos resultados ponen en evidencia el efecto negativo que la aplicación de calor y presión en el proceso de extrusión puede tener sobre la disponibilidad de algunos aminoácidos esenciales, caso de la lisina (Moughan y Rutherford, 1996). Sin embargo, cuando se estimó la UPN por el método de sacrificio, la dieta no extrusionada mostró un valor inferior (14,4%, $P>0,05$) que la dieta extrusionada. Por otra parte, la UPNrs fue, en todas las dietas, cuantitativamente menor que la UPNr, lo cual puede estar en parte relacionado con una posible pérdida de heces y orina durante los balances. Henry (1965) obtuvo valores de UPNrs para la caseína (0,743) similares a los obtenidos en este trabajo (0,735) e inferiores a la UPNr estimada por balance. No obstante, los valores medios de UPNrs obtenidos con las dietas PNE y PE (0,375 y 0,429, respectivamente) son también muy bajos, teniendo en cuenta que la proteína del pienso de perros era aportada a partes iguales por cereales y harina de ave. Por otra parte, la UPNrs mostró mayor coeficiente de variación (10,8%) que la UPNr (6,9%).

Los valores obtenidos con todos los métodos estudiados estuvieron significativamente correlacionados ($p<0.001$). Así, los valores de PER y NPR estuvieron altamente correlacionados con los valores de UPNrs ($r=+0,822$ y $+0,811$, respectivamente), aunque las relaciones lineales entre dichos parámetros mostraron coeficientes de variación (CV) elevados (19,9 y 20,4 %, respectivamente). La correlación entre los valores de PER y NPR con los de UPNr fue ligeramente inferior ($+0,726$ y $+0,724$, respectivamente), si bien las relaciones lineales entre dichos parámetros mostraron menores CV (14,4% en ambos casos). La relación entre los valores de UPNr y UPNrs, vino definida por la ecuación: $UPNrs = 1,073 (\pm 0,1714) UPNr - 0,1597 (\pm 0,1096)$ ($r = 0,781$, $RSD = 0,112$, $CV = 21,8\%$), con un

coeficiente de regresión no diferente de la unidad y una ordenada en el origen negativa (aunque no significativamente diferente de cero), lo que pone de manifiesto la subestimación de los valores UPNrs en relación a los valores UPNr.

Los resultados obtenidos sugieren que todos los métodos e índices estudiados son suficientemente sensibles para poner en evidencia las diferencias en el valor proteico entre proteínas de muy elevada calidad (como la caseína) y proteínas de menor calidad (cereales y harina de aves). Los índices de crecimiento y balance de nitrógeno, también mostraron una respuesta cualitativa similar al efecto de la extrusión sobre el valor proteico de una mezcla de cereales y harina de ave, si bien el método de balance se mostró más sensible. El método de sacrificio, en las condiciones en las que se desarrolló en este experimento, mostró menor sensibilidad y mayor variabilidad, y ofreció valores de eficiencia de utilización de la proteína más bajos de los esperados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC, 2000. ● Henry, K.M. 1965. Brit.J.Nutr. 19: 125-135. ● Miller, D.S. & Bender, A.E. 1955. Br. J. Nutr. 9: 382-388. ● Moughan, P.J. & Rutherford, S.M. 1996. J. Agri. Food Chem. 44: 2202-2209. ● NRC, 1987. ● SAS, 2000.

Tabla 1. Efecto del tipo de proteína (caseína, pienso de perros no extrusionado, PNE, y pienso de perros extrusionado PE) sobre la razón de eficiencia proteica (PER), la retención proteica neta (NPR) y la utilización proteica neta (UPN) aparente (UPNa) y real (UPNr), determinada por distintos métodos.

Método	Índice	Caseína	Dieta PNE	PE	e.e.	P
Crecimiento	PER	3,061a	2,169b	2,082b	0,1009	***
	NPR	3,579a	2,604b	2,471b	0,1001	***
Balance	UPNr	0,790a	0,572b	0,520c	0,0144	***
Sacrificio	UPNrs	0,735a	0,375b	0,429b	0,0184	***

Dentro de cada fila, medias con distinta letra difieren significativamente ($P < 0,05$), test de Tukey.

***, $P < 0,001$

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por la empresa ALEXAN ARTESA S.L.

RESPONSES TO PROTEIN EXTRUSION OF A COMMERCIAL DRY DOG FOOD EVALUATED BY GROWTH, NITROGEN BALANCE AND CARCASS RETENTION TRIALS IN RATS

ABSTRACT: Nutritive responses to different protein sources (casein vs. cereals and poultry meal) and process (unextruded vs. extruded) were evaluated with rats by different methods: growth (protein efficiency ratio, PER and net protein ratio, NPR), nitrogen balance (net protein utilisation, NPUr) and body nitrogen retention (NPUrs). All of the studied protein value indexes were higher ($P < 0.001$) with casein diet than with cereal and poultry meal, whereas NPUr ($P < 0.05$), and PER and NPR ($P > 0.05$) decreased after extrusion. By contrast, NPUrs increased numerically ($0.10 > P > 0.05$) with protein extrusion. Nevertheless, PER and NPR were highly correlated with UPNrs ($r = +0.822$ and $+0.811$, respectively) and UPNr ($r = +0.726$ and 0.724 , respectively). There was also relatively good agreement between NPUrs and NPUr ($r = +0.781$, $CV = 21.8\%$), although the former index was higher than the latter. In conclusion, all of the methods detected differences between casein and a lower quality protein mix, but only nitrogen balance method showed a clear response to extrusion effect.

Keywords: protein quality, extrusion, nitrogen balance, protein efficiency ratio, rats.

EFFECTOS DE INCORPORAR SALVADO DE TRIGO Y MODIFICAR EL TRÁNSITO DIGESTIVO SOBRE LA ADAPTACIÓN DEL LECHÓN RECIÉN DESTETADO

Molist, F., Ywazaki, M., Gómez de Segura, A., Hermes, R.G., Gasa, J. y Pérez
Grup de Nutrició, Maneig i Benestar Animal. Departament de Ciència Animal i dels Aliments.
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 08193. Barcelona. francesc.molist@uab.es

INTRODUCCIÓN

En la producción porcina, la etapa de transición al alimento sólido desde la lactancia es posiblemente uno de los periodos más críticos en la vida del cerdo. Tras el destete, los lechones reducen su consumo de alimento y con ello se desencadenan cambios bruscos en el tracto digestivo, como son estancamiento de la digesta, y una mala digestión y absorción. Recientemente algunos autores han sugerido incorporar ingredientes fibrosos en la ración debido a su efecto prebiótico y la capacidad de modificar las características fisicoquímicas y cinéticas de la digesta. Mateos et al. (2006) sugieren que los cerdos tras el destete tienen un requerimiento mínimo de fibra para optimizar la función intestinal. En un estudio reciente observamos que la inclusión en la ración de salvado de trigo en hoja (WB) disminuyó la población de enterobacterias y aumentó la concentración de butirato en la digesta del colon de los lechones recién destetados (Molist et al., 2008). En el presente ensayo, nos planteamos como hipótesis que la inclusión de WB en la ración puede modular la actividad microbiana al reducir el tiempo de tránsito, y con ello los efectos negativos derivados del estancamiento digestivo tras el destete. Para esclarecer esta hipótesis incorporamos, como factor de variación, la administración diaria de un fármaco (loperamida; LOP) capaz de reducir la motilidad intestinal y aumentar el tiempo de retención intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 128 animales con un peso inicial de $6,4 \pm 1,17$ kg y 24 ± 3 días de edad al destete, que fueron organizados en 3 bloques de peso (1 ligero, 1 pesado y 2 intermedios) y distribuidos en cuatro salas de ocho corrales cada uno (4 animales/corral). Se administró a los lechones una dieta control (CT) basada en maíz (29%), cebada (21%) y trigo (23%) y una dieta suplementada con un 4% de salvado de trigo (WB) en la ración base. Ambos grupos fueron subdivididos en corrales no tratados con LOP (0) y tratados con LOP. Las raciones se administraron a voluntad durante un período de 13 días y la LOP se administró diariamente vía oral (0,07 mg/kg) por las 8.00 am. El consumo de pienso y la ganancia de peso fueron registrados a día 7 y 13. La digestibilidad aparente se determinó mediante la incorporación de un marcador inerte (Cr_2O_3 ; 0.15%) en la ración a partir del día 10 de experimento. El día 13 se recogieron muestras de heces para analizar la población microbiana mediante la técnica de PCR cuantitativa, y su actividad fermentativa mediante la determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.1 siguiendo el modelo: $Variable\ dependiente_{ijk} = media_i + dieta_j (WB-0, WB) + efecto\ LOP_k (no/sí\ tratamiento) + error_{ijk}$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los resultados productivos y de digestibilidad aparente de la materia orgánica (MO) y la proteína bruta (PB). El tratamiento de los animales con LOP, resultó en un aumento del consumo de alimento y de la ganancia de peso, fundamentalmente con la ración que incluía WB. Los resultados sugieren que el efecto relajante digestivo de la LOP (Haven-Hudkins et al., 1999) determinó un incremento en el consumo de alimento. Por otra parte, la reducción de la motilidad intestinal mediante la incorporación de LOP (Theodoru et al., 1991) aumentó la digestibilidad fecal de la PB y tendió a aumentar la digestibilidad fecal de la MO. Las mejoras en el consumo y digestibilidad explicaron el mayor crecimiento diario de los lechones tratados con LOP. La inclusión de fibra en la ración tuvo un impacto positivo al aumentar la eficiencia de utilización

del alimento, probablemente debido en parte al mayor peso de los órganos internos (Pond et al., 1986). Por el contrario la inclusión de WB en la ración resultó en una disminución de la digestibilidad de la MO, que fue en parte compensada por la administración simultánea de LOP. En la Tabla 2 se presentan los resultados de AGV y la población microbiana en las heces de los animales a los 13 días postdestete. El tratamiento de los animales con LOP aumentó la cantidad de AGV en las heces de los animales que recibían WB y promovió una mayor formación de butirato. Este efecto se puede atribuir al aumento del tiempo de permanencia de la digesta en los compartimientos intestinales, lo que puede permitir una mayor fermentación de la MO. Por su parte, el aporte de fibra resultó en un descenso en la fermentación proteica, como refleja el menor contenido en ácidos grasos ramificados, y el descenso en la cantidad de enterobacterias. Este resultado concuerda con los obtenidos en ensayos anteriores de nuestro grupo (Molist et al., 2008) en el que también observamos descensos significativos en el conteo de enterobacterias asociados a la incorporación de WB. Es interesante resaltar que el descenso en el conteo de enterobacterias con el WB fue independiente de la incorporación simultánea de LOP y por lo tanto del tiempo de retención de la digesta.

Los resultados confirman que la incorporación de salvado reduce la población de enterobacterias en el intestino. Sin embargo, su posible efecto positivo sobre el crecimiento de los animales es más pronunciado cuando simultáneamente se incorpora en la ración un fármaco que reduce el tránsito digestivo (LOP). Contrariamente a la hipótesis inicial, los resultados sugieren que la incorporación de un ralentizador intestinal puede acelerar la maduración digestiva e incrementar el rendimiento del lechón. Sin embargo, es necesario continuar estudiando los mecanismos y las implicaciones de esta interacción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haven-Hudkins, D.L., Burgos, L., Cortes, Cassel, J.A., Daubert, J.D., DeHaven, R.N., Mansson, E., Nagasaka, H., Yu, G., Yaksh, T. 1999. *J. Phar. Exp. Thr.* 289:494-502.
- Mateos, G.G., Martín, F., Latorre, M.A., Vicente, B., Lázaro, R. 2006. *Anim. Sci.* 82:57-63.
- Molist, F., A., Gómez de Segura, J., Gasa, R.G., Hermes, E.G., Manzanilla, M., Anguita, J.F., Pérez. 2008. *Anim. Feed Sci Tech.* Accepted
- Pond, W.G., Pond, K.R., Ellis, W.C., Matis, J.H. 1986. *J. Anim. Sci.* 63:1140-1149.
- Theodorou, V., Fioramonti, J., Hachet, T., Bueno, L. 1991. *Gut.* 11:1355-1359.

Agradecimientos: El presente trabajo ha sido realizado en el marco del Proyecto CYCIT AGL2005-07438-C02-01(2006-2009).

EFFECTS OF INCLUDING WHEAT BRAN AND MODIFYING THE DIGESTIVE TRANSIT TIME IN WEANED PIGS

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the effects of incorporating wheat bran (WB) in the diet on the digestive function and microbial activity in newly-weaned pigs. A total of 128 piglets (24 ± 3 d) were assigned randomly to 1 of 4 experimental diets. Dietary treatments consisted on a control diet (CT) based on corn, barley and whey which was supplemented with 4 % WB. These two treatments were subdivided in non-loperamide (LOP) (0) treated and LOP treated animals. At day 13 postweaning animals treated with LOP showed a higher average daily gain and feed intake especially in the animals fed with WB. LOP also increased the faecal crude protein PB and organic matter (OM) digestibility, whereas WB reduced the OM digestibility. LOP treatment also affected the microbial activity increasing the concentration of short-chain fatty acids and butyric acid in the faeces, especially in animals that consumed WB. On the other hand, WB inclusion tended to reduce the enterobacteria counts. It can be concluded that inclusion of WB at 4% combined with LOP improved the performance and the health status of the piglets.

Keywords: wheat bran, transit time, loperamide, piglets.

Tabla 1. Consumo diario (CMD), ganancia de peso diario (GMD), Índice de eficiencia alimentaria y digestibilidad aparente en lechones.

	Dietas ^a							
	CT		WB		e.e.		P-dieta ^b	
	0	LOP	0	LOP	0	LOP	DIET	D*L
Peso inicial (kg)	6,43	6,40	6,39	6,39	1,139	0,9521	0,9700	0,9685
Peso final (kg)	8,59	8,85	8,61	9,63	1,278	0,3818	0,1683	0,4082
GMD (g/animal y día)	270,82 ^y	293,02 ^x	252,56 ^y	324,96 ^x	37,501	0,6100	0,0013	0,0687
GMD (g/animal y día)	156,96 ^y	170,33 ^y	156,11 ^y	238,31 ^x	47,031	0,0532	0,0077	0,0478
Índice de eficiencia alimentaria	0,57 ^y	0,57 ^y	0,62 ^x	0,73 ^x	0,115	0,0135	0,1728	0,1737
Digestibilidad materia orgánica	83,16 ^x	83,70 ^x	72,01 ^y	78,03 ^y	6,745	<0,0001	0,0614	0,1159
Digestibilidad proteína	83,80 ^{xz}	84,62 ^{xw}	68,73 ^{yz}	76,00 ^{yw}	6,958	<0,0001	0,0260	0,0738

Tabla 2. Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) en heces y poblaciones bacterianas (*Enterobacterias* y *Lactobacillus*) obtenidas mediante PCR a tiempo real (log 16S rDNA gene copies /g FM) en heces de lechones recién destetados.

	Dietas ^a							
	CT		WB		e.e.		P-dieta ^b	
	0	LOP	0	LOP	0	LOP	DIET	D*L
Total AGV	103,12 ^{xy}	102,15 ^{xy}	89,06 ^y	114,76 ^x	18,338	0,8833	0,0150	0,0090
Acético (%)	64,51	62,72	63,02	62,47	3,845	0,5936	0,5334	0,2845
Butírico	8,40 ^y	9,96 ^x	9,35 ^y	10,03 ^x	1,791	0,2305	0,0252	0,3658
Propiónico	21,53	21,24	21,98	20,74	1,919	0,9175	0,1390	0,3557
Ramificados	3,33	3,76	3,18	2,86	1,319	0,1846	0,8640	0,2984
<i>Enterobacteria</i>	9,00	9,32	8,81	8,52	0,681	0,0889	0,9652	0,2953
<i>Lactobacillus</i>	9,57	9,37	9,41	9,12	0,462	0,2909	0,2160	0,8176

^aDietas: CT-0, dieta control; CT-LOP, dieta control + loperamida; WB-0, dieta salvado de trigo; WB-LOP, dieta salvado de trigo + loperamida.
^bP-dieta: DIET, efecto de la dieta CT ó WB; LOP, efecto de los animales tratados con loperamida; D*L, efecto interacción de la dieta y loperamida.
^{x,y} Valores con letras diferentes en la misma fila difieren entre sí ($P < 0,05$).

INFLUENCIA DEL CEREAL Y EL NIVEL DE FIBRA SOBRE LA INGESTIÓN DE PIENSO Y LOS PARÁMETROS DIGESTIVOS DEL LECHÓN

Hermes, R.G.¹, Molist, F.¹, Ywazaki, M.¹, Gómez de Segura, A.¹, Torrallardona, D.², Gasa, J.¹ y Pérez, J.F.¹

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona. josefrancisco.perez@uab.es. ²IRTA, Mas de Bover, Constantí, Tarragona.

INTRODUCCIÓN

La fermentación de proteína en el tracto digestivo de los lechones se considera uno de los mecanismos que predisponen la diarrea, la disbiosis, y la liberación de productos irritantes para la mucosa intestinal, como es el amoníaco. Para reducir esta fermentación proteica se ha sugerido reducir los niveles de proteína bruta (PB) o incrementar el aporte de carbohidratos fermentables en la ración (Awati et al., 2006). Aumentando la cantidad de carbohidratos fermentables, a través de la inclusión de lactosa (Pierce et al., 2007), salvado de trigo, pulpa de remolacha o almidón resistente, algunos estudios han observado incrementos en la concentración de ácido láctico y butírico en la digesta (Carneiro et al., 2007) y descensos en los recuentos de coliformes en el intestino delgado (Bikker et al., 2007). Sin embargo, ajustar los niveles y la composición de la fibra de la ración depende fundamentalmente de la elección del cereal a utilizar en la ración base, y de la incorporación de ingredientes fibrosos. El objetivo del estudio fue evaluar la repercusión productiva y digestiva de incorporar una cantidad moderada de ingredientes fibrosos (salvado y pulpa de remolacha) en dos dietas diferenciadas por el cereal principal utilizado (arroz o cebada).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 96 lechones de la granja experimental de IRTA Mas de Bover (Constantí, Tarragona) que fueron destetados a los 26 días de edad con un peso medio de $7,6 \pm 1,7$ kg de peso vivo (PV). Durante los primeros 14 días, los animales recibieron en la misma granja 2 posibles raciones experimentales (48 animales/tto) en base a arroz o cebada (60%), proteína vegetal (20%) y productos lácteos (15%). Tras las 2 primeras semanas (40 días de edad), los 96 animales ($9,07 \pm 0,36$ kg PV) fueron transportados a la granja experimental de la UAB, organizados en función del peso y la ración base a la que estaban acostumbrados, y distribuidos en 32 corrales (3 animales/box). A partir de ese momento y durante 3 semanas se administró *ad libitum* cuatro dietas (8 replicas/Tto) diferenciadas en el tipo de cereal (arroz o cebada) y el aporte o no de fibra en un diseño 2x2 factorial. La suplementación con fibra se realizó con la inclusión de un 4% de salvado de trigo y un 2% de pulpa de remolacha. Las raciones fueron isoenergéticas (EM, 10.32 MJ/kg) e isoproteicas (PB, 18.8%), según especificaciones de BSAS (2003). Los niveles de fibra neutro detergente (FND) fueron 2,8 y 3,6% en la ración de arroz, y 12,2 y 13,4% en la ración de cebada sin suplementar y suplementada con fibra, respectivamente.

El peso y consumo de los animales se registró semanalmente. Diariamente se supervisó el estado de los animales para detectar posibles casos de diarrea. El último día experimental se recogieron muestras rectales de heces de un animal por corral (32 muestras) para el análisis microbiológico (recuento en placa). Ese mismo día se sacrificaron 32 animales (1 animal/corral con el peso intermedio del grupo), con una inyección intravenosa de pentobarbital (200 mg/Kg PV). Para realizar el muestreo digestivo, e inmediatamente tras el sacrificio, se sangraron los animales, se abrió el abdomen y se extrajo el tracto digestivo. El estómago, el intestino delgado y el grueso fueron separados por ataduras dobles, pesados (con su contenido) y muestreados. Se recogieron muestras del colon proximal y se conservaron a -20°C para realizar posteriormente el análisis del contenido en ácidos grasos volátiles y amoníaco.

Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.1 (1999), en un análisis factorial, siguiendo el modelo: Variable dependiente_{ijk} = media + dieta_i (1,...,4) + tipo de cereal_j (ARROZ o CEBADA) + efecto fibra_k (con/sin inclusión) + error^{ijk}. El nivel de significación (alfa) utilizado en todos los análisis fue el 0,05. Cada dato está

presentado por la media cuadrada de las medias (LS means) y el error estándar de la media (e.e.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer día post-destete, los lechones a los que se les ofreció la dieta con Arroz experimentaron un mayor consumo de pienso que a los que les ofreció la dieta con Cebada (19 vs 7 g/d; $P < 0,05$). Durante el resto del periodo pre-estárter (0-14 días), los resultados productivos de los lechones alimentados con Arroz fueron superiores numéricamente a los alimentados con Cebada. Entre los días 14-35, los lechones que consumieron la dieta con Arroz comieron más (785 vs 677 g/d; $P = 0,03$, Tabla1) y tendieron a tener un peso vivo final mayor (19,6 vs 18,5 kg, $P = 0,067$) comparado a los animales que consumieron la dieta basada en Cebada. No se observaron diferencias significativas asociadas a la inclusión de salvado y pulpa.

Tabla 1. Efectos del tipo del cereal y del nivel de inclusión de fibra en la ganancia de peso vivo (PV, kg), la ingestión media diaria (IMD, g/animal y día), la ganancia media diaria (GMD, g/animal y día) y el índice de eficiencia alimentaria (G:A, ganancia en g PV/g alimento consumido) en lechones de 14 a 35 días post destete.

	Cereal	Dietas				e.e.	P valores		
		Arroz		Cebada			cereal	fibra	c x f
		Bajo	Alto	Bajo	Alto				
PV	d0	7,63	7,64	7,56	7,63	0,05	0,369	0,355	0,611
	d14	9,12	8,87	9,23	9,07	0,36	0,246	0,117	0,723
	d35	19,34	19,78	18,37	18,71	1,51	0,067	0,474	0,911
IMD	d14-35	791	779	671	682	125	0,027	0,853	0,763
GMD	d14-35	487	510	443	461	97	0,351	0,484	0,835
G:A	d14-35	0,62	0,68	0,69	0,69	0,11	0,366	0,404	0,707

Los animales alimentados con la ración de Cebada presentaron mayor ($P < 0,001$) peso relativo del TGI total (2,1 vs 2,7% del PV) y del intestino grueso (0,81 vs 1,27% del PV) que los animales de la dieta de Arroz (Tabla 2). La suplementación con Fibra incrementó también el peso relativo del intestino grueso (4,8 vs 5,4% del PV). La incorporación de una mayor cantidad de FND con la ración de cebada o la suplementación con salvado y pulpa determinaron un descenso ($P < 0,05$) en la concentración de amoníaco y en el porcentaje de isoácidos entre los AGV (2,0 vs 1,0%/AGV para las raciones de arroz y cebada respectivamente, $P = 0,007$), lo que refleja un descenso en la fermentación proteica. No observamos diferencias significativas en la producción total de ácidos grasos volátiles. Sin embargo, las dietas basadas en Cebada presentaron una proporción mayor de ácido propiónico (25,0 vs 29,3%/AGV, $P = 0,001$). La ración de cebada tendió ($P < 0,10$) a tener un menor número de coliformes que la dieta basada en Arroz (6,01 vs 6,56 Log UFC/g heces). Por su parte, la suplementación con salvado y pulpa aumentó los recuentos de enterococos (4,31 vs 5,39 Log UFC/g heces, $P = 0,015$).

En su conjunto, los resultados reflejan que, para niveles similares de energía metabolizable, la administración de arroz incrementa los resultados productivos. Estos resultados confirman la elevada apetecibilidad del arroz, o el efecto depresor sobre el consumo de un nivel elevado de fibra (>12% FND). Sin embargo, el arroz aumentó la concentración de metabolitos de la fermentación proteica en el colon y tendió a aumentar la excreción fecal de coliformes. La incorporación de salvado y pulpa de remolacha permite atenuar estos efectos, al reducir la concentración de amoníaco e incrementar el número de enterococos (bacterias pertenecientes al género de bacterias del ácido láctico y consideradas beneficiosas).

Tabla 2. Efectos del tipo del cereal y del nivel de inclusión de fibra en el peso relativo del tracto gastrointestinal (TGI), en la concentración de amoníaco, y ácidos grasos volátiles (AGV, en mM/L) en digesta del colon proximal, y en los recuentos de enterococos y coliformes (en Log de UFC/g heces) en lechones con 35 días post destete.

	Cereal	Dietas				e.e.	P valores		
		Arroz		Cebada			cereal	fibra	c x f
		Bajo	Alto	Bajo	Alto				
TGI (% PV)									
Total		9,9	10,5	12,6	13,1	1,38	<0,001	0,277	0,894
Intestino Grueso		3,8	4,2	5,7	6,6	0,86	<0,001	0,044	0,493
Amoniaco (mM/L)		15,8	12,5	12,6	8,9	3,91	0,019	0,016	0,861
AGV Totales (mM/L)		113	129	129	121	31,9	0,744	0,716	0,308
AGV Perfil (%)									
Acético		55,75	55,84	52,39	56,17	4,58	0,262	0,158	0,421
Propiónico		24,52	25,39	30,30	28,32	2,98	0,001	0,621	0,206
Butírico		11,85	11,36	10,65	10,99	2,61	0,416	0,924	0,662
Isoácidos ¹		2,33	1,70	1,03	0,97	0,98	0,007	0,328	0,424
Enterococos (log UFC/g)		4,508	5,891	4,109	4,885	1,114	0,110	0,015	0,397
Coliformes (log UFC/g)		6,708	6,419	6,156	5,859	0,941	0,100	0,386	0,991

¹Suma de los ácidos isobutírico e isovalérico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Awati, A., B. A. Williams, M. W. Bosch, W. J. J. Gerrits, y M. W. A. Verstegen. 2006. J. Anim. Sci. 84: 2133-2140. • BSAS, 2003. Brit. Soc. Anim. Sci. 2003. • Carneiro, M., M. Lordelo, L. F. Cunha, y J. Freire. 2007. Livest. Sci. 108: 262-265. • Mateos, G. G., M. Martín, M. A. Latorre, y R. Lázaro. 2006. Anim. Sci. 82: 57-63. • Pierce, K. M., J. J. Callan, P. McCarthy, y J. V. O'Doherty. 2007. Anim. Feed Sci. and Tech. 132: 267-282.

Agradecimientos: El presente trabajo ha sido realizado en el marco del Proyecto CYCIT AGL2005-07438-C02-01(2006-2009).

EFFECTS OF TYPE OF CEREAL AND FIBRE LEVEL ON GROWTH AND DIGESTIVE MATURATION PARAMETERS IN YOUNG PIGS

ABSTRACT: The objective of the present study was to evaluate the influence of the cereal and the fibrous ingredients in the diet on the adaptation of piglets to weaning. A total of 96 piglets (9.07 ± 0.36 kg BW, 26 d old) were distributed into two dietary treatments based (60%) on rice (R) or barley (B) with or without fibre supplementation (4% of wheat bran and 2% of sugarbeet pulp), with 8 replicates of 3 animals per treatment, in a 2x2 factorial design. Piglets fed on diet R ate more ($P = 0.03$) and tended to have ($P = 0.067$) a higher final BW. Piglets fed on diet B had heavier ($P < 0.01$) GIT and large intestine than piglets fed on diet R. Fibre supplementation did not affect performance but also resulted in a heavier large intestine and decreased ($P < 0.05$) the ammonia concentration as compared to non-supplemented diets. Diet B showed a higher proportion of propionic acid ($P = 0.001$) and a lower proportion of isoacids ($P = 0.007$) as compared to diet R. The experimental diets also modified the microbial counts in the faeces. Diet B tended ($P < 0.10$) to have a lower number of coliforms than diet R and fibre supplementation increased the number of Enterococci ($P = 0.015$).

Keywords: rice, barley, fibre, piglets.

INFLUENCIA DE LA FUENTE DE ALMIDÓN Y PROTEÍNA DEL PIENSO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LOS NUTRIENTES Y RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE LECHONES

Parera, N.¹, Serrano, M.P.¹, Valencia, D.G.², Lázaro, R.¹ y Mateos, G.G.¹

¹Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid. gonzalo.gmateos@upm.es. ²Nutral S.A., Dpto. Nutrición/Formulación, C/ Cobalto, 261-263. 28770 Colmenar Viejo, Madrid.

INTRODUCCIÓN

El destete es un momento crítico en la vida de los lechones. Tradicionalmente, los piensos postdestete se basaban en ingredientes de origen animal e incluían antibióticos con el fin de prevenir la incidencia de diarreas. Sin embargo, la nueva normativa europea prohíbe el uso de antibióticos como preventivos, lo que junto al elevado precio de las materias primas de origen animal y la preferencia del consumidor por carne de porcino producida con ingredientes vegetales, ha creado la necesidad de buscar nuevas fuentes de energía y proteína para estos piensos. El almidón es la principal fuente de energía en piensos para porcino y su digestibilidad depende del tipo de cereal (Medel *et al.*, 1999, 2004) y del procesado térmico (Vicente *et al.*, 2009). El maíz es el cereal más común en piensos para lechones. El uso del arroz está limitado por su coste y falta de información del valor nutricional (Mateos *et al.*, 2006) pero su digestibilidad es mayor que la del maíz (Mateos *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2008). El descascarillado del guisante seguido de molienda fina y clasificación por aire separa la fracción almidón de la fracción proteína (CPG), que pueden usarse en estas dietas en sustitución del cereal o del concentrado de proteína de soja (CPS), respectivamente (Valencia *et al.*, 2008a). En este trabajo se evalúa el efecto de tres fuentes de almidón (maíz cocido, arroz cocido y almidón micronizado de guisante) y dos fuentes de proteína vegetal (CPS y CPG) sobre la digestibilidad fecal de los nutrientes y el rendimiento productivo de lechones de 29 a 53 d de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 216 lechones (Pietrain x Large White) x (Landrace x Large White) de $9,0 \pm 1,5$ kg y 29 ± 3 d de edad al inicio de la prueba. Se utilizó un diseño factorial con 3 fuentes de almidón (maíz cocido, arroz cocido y almidón de guisante) y 2 de proteína (CPS y CPG). Se formularon 6 dietas en las que se incluían 470 g de una de las 3 fuentes de almidón y 94,5 g de CPS ó CPG/kg. Todas ellas contenían el mismo nivel de energía (10,3 MJ EN/kg) y de lisina digestible (12,3 g/kg). Cada tratamiento se replicó 6 veces (6 lechones alojados conjuntamente). Se midió la digestibilidad de la proteína bruta (PB), materia seca (MS), materia orgánica (MO) y energía bruta (EB) a 36 d de edad. Se controló la ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario (CMD), el índice de conversión (IC) y la incidencia de diarreas (ID) a 36 y 53 d de edad. Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute, 1990) para diseños al azar organizados de forma factorial. Los resultados de ID se analizaron a través del procedimiento CATMOD. En el modelo se incluyeron los efectos principales y su interacción. La separación de medias se hizo mediante el test de Tukey. Para los parámetros productivos se usó el peso inicial como covariable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A 36 d de edad la digestibilidad de la MS (0,882 vs. 0,843 y 0,870), MO (0,910 vs. 0,874 y 0,898) y EB (0,890 vs. 0,852 y 0,878) fue mayor con el arroz cocido que con el maíz cocido ($P < 0,001$), con los piensos basados en almidón de guisante micronizado intermedios (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los observados por Mateos *et al.* (2006) y Vicente *et al.* (2008), comparando arroz y maíz cocido. Por otro lado, en contraposición a nuestros resultados, Gatel y Grosjean (1990) encontraron mayor digestibilidad de la energía para el

grano de maíz que para el de guisante, indicando que la fracción de almidón era más digestible en el caso del maíz. El guisante utilizado en nuestro ensayo había sido previamente micronizado, lo que podría explicar el aumento de su digestibilidad en relación con el maíz. La molienda fina mejora la utilización de la energía en porcino (Healy *et al.*, 1994). Sin embargo, Valencia *et al.* (2008b) y Medel *et al.* (2000) no encontraron beneficio alguno con moliendas finas. Estas discrepancias entre autores pueden ser debidas al tipo de cereal utilizado y el grado de molienda de los mismos. De 29 a 36 d de edad los lechones que consumieron arroz cocido crecieron más (292 vs. 220 y 229 g/d; $P < 0,01$) y tuvieron mejor IC (0,89 vs. 1,07 y 1,03; $P < 0,01$) que los que consumieron almidón de guisante micronizado o maíz cocido (Tabla 2). La mejora de la GMD observada con el arroz cocido puede deberse al mayor consumo (260 vs. 234 y 226 g/d; $P > 0,10$) con respecto a los lechones que recibieron almidón de guisante o maíz cocido, respectivamente. De 36 a 53 d de edad, los lechones que consumieron arroz cocido tuvieron mayor GMD (467 vs. 379 y 419 g/d; $P < 0,01$) y CMD (468 vs. 375 y 404 g/d; $P < 0,01$) que los alimentados con almidón de guisante o maíz cocido, respectivamente. Por otro lado, el ID no se vio afectado por la fuente de almidón, dato que no concuerda con los obtenidos por Pluske *et al.* (1998, 2005), quienes observaron que los lechones infectados experimentalmente con *Serpulina hyodysenteriae* o *Escherichia coli* tenían menos diarreas cuando eran alimentados con arroz cocido que cuando consumían dietas basadas en otros cereales. La diferencia entre ensayos puede radicar en que, en nuestra prueba, los lechones provenían de una granja limpia, libre de enfermedades contagiosas y no fueron infectados experimentalmente. La fuente de proteína utilizada no afectó a la digestibilidad de los nutrientes excepto para la PB que fue ligeramente superior con CPS que con CPG (0,840 vs. 0,825; $P < 0,01$), lo que concuerda con los datos de Christison y Parra de Solano (1982) y Valencia *et al.* (2009). La fuente proteica tampoco tuvo efecto alguno sobre los rendimientos productivos, resultados que discrepan con los obtenidos por Valencia *et al.* (2008a) que encontraron un efecto negativo de la inclusión de CPG sobre la ingesta. Sin embargo, en dicho ensayo la diferencia de consumo entre las dietas con CPS y CPG desaparecía con la edad.

Se concluye que el arroz cocido es la fuente de energía de preferencia en lechones y que el almidón de guisante micronizado puede utilizarse en sustitución del maíz cocido en estos piensos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Christison, G. I. y Parra de Solano, N. M. 1982. *J. Anim. Sci.* 62: 899-905.
- Gatel, F. y Grosjean, F. 1990. *Livest. Prod. Sci.* 26: 155-175.
- Healy, B. J., Hancock, J. D., Kennedy, G. A., Bramel-Cox, P. J., Behnke, K. C. y Hines, R. H. 1994. *J. Anim. Sci.* 72: 2227-2236.
- Mateos, G. G., Martín, F., Latorre, M. A., Vicente, B. y Lázaro, R. P. 2006. *Anim. Sci.* 82: 57-63.
- Mateos, G. G., López, E., Latorre, M. A., Vicente, B. y Lázaro, R. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135: 100-112.
- Medel, P., Salado, S., De Blas, J. C. y Mateos, G. G. 1999. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 82: 145-156.
- Medel, P., García, M., Lázaro, R., De Blas, C. y Mateos, G. G. 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84: 13-21.
- Medel, P., García, M., Latorre, M. A., De Blas, C., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2004. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113: 127-140.
- Pluske, J. R., Durmic, Z., Pethick, D. W., Mullan, B. P. y Hampson, D. J. 1998. *J. Nutr.* 128: 1737-1744.
- Pluske, J. R. y Hampson, D. J. 2005. RIRDC Publication No. 05/143.
- SAS Institute. 1990. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC, USA.
- Valencia, D. G., Serrano, M. P., Centeno, C., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008a. *Livest. Prod. Sci.* 118: 1-10.
- Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R., Latorre, M. A. y Mateos, G. G. 2008b. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 147: 340-356.
- Valencia, D. G., Serrano, M. P., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2009. *Livest. Sci.* doi: 10.1016/j.livsci.2008.05.013.
- Vicente, B., Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. *J. Anim. Sci.* 86: 119-126.
- Vicente, B., Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2009. *Br. J. Nutr.* doi: 10.1017/S0007114508060789.

Tabla 1. Efecto de la dieta sobre el coeficiente de digestibilidad fecal de los nutrientes a 36 d de edad

	Fuente de energía			Fuente de proteína		e.e (n=6)	Efecto ¹	
	Maíz	Arroz	Guisante ²	CPS ³	CPG ⁴		1	2
PB	0,829	0,839	0,829	0,835 ^a	0,819 ^b	0,0069	NS	**
MS	0,843 ^c	0,882 ^a	0,870 ^b	0,869	0,862	0,0047	***	NS
MO	0,874 ^c	0,910 ^a	0,898 ^b	0,897	0,892	0,0017	***	NS
EB	0,852 ^c	0,894 ^a	0,878 ^b	0,876	0,871	0,0021	***	NS

NS: no significativo; ** P<0,01; *** P<0,001. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas (P<0,05).

¹ Efecto de la fuente de almidón o de la fuente de proteína. ² Almidón de guisante micronizado. ³ Concentrado de proteína de soja. ⁴ Concentrado de proteína de guisante.

Tabla 2. Efecto de la dieta sobre la productividad de los lechones (29 a 53 d de edad)

Edad	Fuente de energía			Fuente de proteína		e.e. (n=6)	Efecto ¹	
	Maíz	Arroz	Guisante ²	CPS ³	CPG ⁴		1	2
29-36 d								
GMD (g)	229 ^b	292 ^a	220 ^b	239	255	17,81	**	NS
CMD (g)	228	260	234	237	245	14,43	NS	NS
IC	1,03 ^{ab}	0,89 ^a	1,07 ^b	1,02	0,97	0,057	**	NS
ID	7,4	8,9	6,0	7,7	7,1	-	NS	NS
36-53 d								
GMD (g)	419 ^{ab}	467 ^a	379 ^b	427	416	19,40	**	NS
CMD (g)	404 ^b	468 ^a	375 ^b	426	406	21,16	**	NS
IC	0,97	1,00	1,00	1,00	0,98	0,039	NS	NS
ID	10,9	12,5	9,7	10,9	11,1	-	NS	NS
29-53 d								
GMD (g)	364 ^b	416 ^a	333 ^b	372	369	15,57	***	NS
CMD (g)	353 ^b	407 ^a	334 ^b	371	359	17,94	***	NS
IC	0,99	0,97	1,02	1,01	0,98	0,031	NS	NS
ID	9,88	11,4	8,6	9,97	9,93	-	NS	NS

NS: no significativo; ** P<0,01; *** P<0,001. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas (P<0,05).

¹ Efecto de la fuente de almidón o de la fuente de proteína. ² Almidón de guisante micronizado. ³ Concentrado de proteína de soja. ⁴ Concentrado de proteína de guisante.

INFLUENCE OF SOURCE OF STARCH AND PROTEIN OF THE DIET ON NUTRIENT DIGESTIBILITY AND PRODUCTIVE PERFORMANCE OF YOUNG PIGS

ABSTRACT: An experiment was conducted to compare 3 sources of starch (cooked maize, cooked rice, and micronized pea starch) and 2 sources of vegetable protein (soya protein concentrate, SPC and pea protein concentrate, PPC) of the diet on the coefficient of total tract apparent digestibility (CTTAD) of nutrients and productive performance of piglets from 29 to 53 d of age. There were 6 treatments arranged factorially with 3 starch and 2 protein sources. Each treatment was replicated 6 times (6 pigs/replicate). Pea starch and PPC were obtained by dehulling pea seeds followed by micronization and air classification. At 36 d of age the CTTAD of organic matter and gross energy was higher for cooked rice than for cooked maize with micronized pea starch being intermediate (P<0.001). The CTTAD of protein was higher for SPC than for PPC (P<0.01). From 29 to 53 d of age piglets fed cooked rice ate more and grew faster than piglets fed micronized pea starch, with those fed cooked maize being intermediate (P<0,001). Micronized pea starch resulted in similar performance to that obtained with cooked maize. The inclusion of PPC reduced slightly protein digestibility but had no effects on piglet performance. The inclusion of cooked rice is recommended in piglet diets. Protein and starch fractions of peas can be used successfully in substitution of SPC or cooked maize in diets for piglets.

Keywords: starch sources; peas; soya protein concentrate; piglets.

EFFECTO DEL NIVEL DE TRIPTÓFANO EN EL PIENSO DE LACTACIÓN SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE LA CERDA Y SUS LECHONES

Muns, R.¹, Solà-Oriol, D.¹, Agostini, P.S.¹, Martín-Orué, S.M.¹, Pérez, J.F.¹, Cirera, M.², Corrent, E.³ y Gasa, J.¹

¹Grup de Nutrició, Maneig i Benestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. UAB.Facultat de Veterinària, 08193 Bellaterra, Barcelona. David.sola@uab.cat.

²Indukern, Mas Blau II, Alta Ribagorça, 6-8, 08820, el Prat de Llobregat, Barcelona.

³Ajinomoto Eurolysine SAS, 153, rue de Courcelles, 75817, París Cedex 17, Francia.

INTRODUCCIÓN

Toda acción que favorezca un mayor número de lechones destetados y/o un mayor peso vivo (PV) al destete minimizando las pérdidas de condición corporal o balance energético de la cerda, se considera positiva para el rendimiento de una explotación. El primer factor limitante es que la cerda consuma la máxima cantidad de pienso siguiendo una curva uniforme de ingestión.

En estudios previos realizados en lechones destetados, se ha demostrado una relación lineal positiva entre el nivel de triptófano en pienso y el consumo medio diario (Zhang *et al.*, 2007). El mismo efecto fue observado por Le Floc'h *et al.* (2007) en cerdos en fase de crecimiento y engorde. En cerdas, las pocas experiencias realizadas muestran mayor consumo y menor pérdida de peso corporal durante la lactación al incrementar los niveles de triptófano del pienso (Paulicks *et al.*, 2006).

El objetivo del presente estudio fue valorar el efecto de la suplementación del pienso de lactación con triptófano sobre el consumo de pienso y la productividad de la cerda y sus lechones.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento fue desarrollado durante los meses de noviembre y diciembre de 2008 en una granja comercial (CollSuri, Manlleu, Barcelona), con un censo de 400 cerdas *Danbreed* y manejo en bandas de 3 semanas. Se utilizó un total de 20 cerdas multíparas (entre el 2º y 6º parto) distribuidas aleatoriamente según su condición corporal y espesor de grasa dorsal entre dos tratamientos, resultando en un total de 9 cerdas en el grupo control (T-1; Trp. Dig. Est. = 0,16%) y 11 en el grupo experimental (T-2; Trp. Dig. Est. = 0,22%). Siguiendo el manejo cotidiano de la granja, no se administró pienso el día del parto y se inició la curva de ingestión administrando cantidades crecientes de pienso de gestación hasta el día 5 post-parto. Del día 5 al 21 de lactación, se administraron los piensos de lactación siguiendo una curva de alimentación *ad libitum* controlado (forzar la ingestión controlando el riesgo de provocar empachos).

Los piensos experimentales fueron formulados en base a maíz (28,3%), cebada (22,4%), harina de Soja 44 (18,3%), guisante (15,0%), pulpa de remolacha (5,0%), salvado de trigo (5,0%) y grasa animal (2,1%) para satisfacer los requerimientos para cerdas lactantes propuestos por FEDNA (2006). En la Tabla 1 se presenta la composición nutritiva de los tratamientos experimentales.

Tabla 1. Composición nutritiva analizada o calculada* de los piensos experimentales.

	T-1	T-2
Materia seca (%)	88.12	88.08
Energía Neta* (Kcal/Kg)	2.400	2.400
Proteína bruta (%)	16.48	16.09
Lis. Dig. Est.*	0.85	0.85
Trip. Dig. Est.*	0.16	0.22
Trip:Lisina (DS)	0.192	0.253

A los 7 y 21 días de lactación se registró la condición corporal (CC) y el espesor de grasa dorsal (GD, obtenida por ultrasonidos a la última costilla) de las cerdas. El consumo de pienso de las cerdas fue registrado individualmente entre los días 5 y 21 post-parto. Se registró también el número de lechones nacidos totales, nacidos muertos, destetados y mortalidad. Tras la ingestión del primer calostro, las camadas fueron homogenizadas en número y peso por tratamiento dentro las 12h post-parto. Los lechones fueron individualmente identificados y pesados los días 5 y 21 post-parto y no se les administró “creep feeding”.

Los diferentes parámetros productivos estudiados fueron analizados con ANOVA mediante la subrutina GLM del paquete estadístico SAS®. El modelo matemático utilizado fue: $Y_i = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i$, donde Y es la variable dependiente y α_i es el efecto del tratamiento experimental (T1 ó T2). En el caso del PV individual de los lechones se introdujo en el modelo el PV inicial como co-variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se presentan los resultados de CC, GD y productividad de las cerdas y los lechones, registrados entre el día 5 y 21 de lactación.

Tabla 2: *Parámetros productivos de la cerda y su camada (cerdas de 2º a 6º parto)*

	Tratamiento		$(T-2/T-1)*100$	SD	(Pr>F)
	T-1	T-2			
Cerdas					
n	9	11	-	-	-
Condición Corporal (CC)					
7 d pre-parto	3,11	3,18	102,25	0,355	0,6634
21 d post-parto	2,55	2,65	103,92	0,344	0,5117
Pérdida de CC	0,55	0,52	94,54	0,208	0,7296
Grasa Dorsal (GD en mm)					
7 d pre-parto	16,22	16,00	98,64	4,346	0,9107
21 d post-parto	12,83	12,95	100,93	3,564	0,9405
Pérdida de GD	3,38	3,04	89,94	1,483	0,6128
Parámetros productivos					
Consumo medio diario (5-21d; kg)	6,23	6,44	103,37	0,497	0,3676
Nº lechones nacidos vivos	13,33	13,36	100,22	2,566	0,9793
Nº inicial lechones por camada (5d)	11,55	11,81	102,25	0,996	0,5647
Nº final lechones por camada (21d)	11,33	11,54	101,85	0,963	0,6304
Producción estimada de leche (l/d) ¹	10,58	10,90	103,02	1,531	0,5877
Lechones					
n	102	127	-	-	-
Peso inicial (5d; kg)	2,11	2,03	96,20	0,576	0,3327
Peso final (21d; kg)	5,25	6,32	120,38	0,786	0,0775
Peso/camada (kg)	65,6	67,6	103,21	6,591	0,5130
Ganancia media diaria (5-21d; kg)	0,199	0,262	131,65	0,048	0,0932

¹Paulicks et al. (1998): (promedio camada GMD (por lechón) x 4) x número de lechones.

Aunque no se observaron diferencias significativas en la pérdida de condición corporal (P=0,730) y de grasa dorsal (P=0,613) ni en el consumo medio diario de pienso (P=0,368) de las cerdas; es de destacar que las cerdas que recibieron la suplementación de triptófano perdieron un 5,4% y 10,0% menos de CC y GD respectivamente y consumieron un 3% más de pienso. El hecho de no observar diferencias importantes en el consumo de pienso puede

ser debido tanto a que quizás se mantuvo un criterio demasiado conservador al implementar la curva de ingestión diseñada; como a que las condiciones ambientales de las parideras en ningún caso limitó la capacidad de ingestión de los animales. En este sentido, repetir el experimento en verano, en condiciones de estrés por calor, posiblemente daría lugar a resultados diferentes.

El PV de los lechones al destete y la ganancia media diaria de peso (GMD) tendieron a incrementarse ($P=0,078$ y $P=0,093$, respectivamente) en aquellas madres que recibieron una suplementación de triptófano. Aún tratándose de una tendencia, los lechones del grupo suplementado con triptófano presentan una mejora del 20,7% y 31,7% en el peso vivo al destete y la GMD, respectivamente.

Teniendo en cuenta que las recomendaciones de Triptófano Digestible en Ileon para cerdas en lactación son del 0,14% en invierno y 0,16% en verano, respectivamente (FEDNA, 2006); los resultados sugieren que, en cerdas multiparas *Danbreed*, todavía existe un potencial de mejora en el rendimiento productivo de los lechones cuando se aumenta el nivel de triptófano total en los piensos de lactación de 0,16 a 0,22 % de Triptófano Digestible Ileon Estandarizado.

En conclusión, la suplementación del pienso de lactación de cerdas *Danbreed* con triptófano por encima de las recomendaciones FEDNA (2006), mejora la ganancia media diaria y el peso vivo de los lechones al destete, sin perjudicar ni el balance energético ni la ingestión de pienso de la madre. Los efectos sobre la madre y/o los lechones podrían ser incluso más marcados en condiciones de estrés por calor coincidiendo con el verano, momento en que la ingestión voluntaria de pienso se ve limitada por el calor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FEDNA 2006. de Blas C., Gasa J. y Mateos G.G. p.10
Le Floc'h N. y Seve B. 2007. *Livestock Science*, 112: 23-32
Paulicks B.R., Pampuch F.G. y Roth-Maier D.A. 2006. *J. Anim Phy. and Animal Nutrition*, 90: 474-481
Zhang H., Yin J., Li D., Zhou X., y Li X. 2007. *Domestic Anim Endocrinology*, 33: 47-61.

Agradecimientos: Beca Master Obra Social Fundación 'La Caixa' para R. Muns.

INFLUENCE OF DIETARY TRIPTOPHAN LEVEL DURING LACTATION ON SOW AND LITTER PERFORMANCE

ABSTRACT: The present study aimed to investigate the effect of dietary L-tryptophan supplementation from day 5 to day 21 *post-partum* on sows and litter performance. A total of 20 multiparous sows were fed the same maize-barley based lactation diet only differing in tryptophan level: T1; SID Trp = 0.16 (n=9) and T2; SID Trp = 0.22 (n=11). Body condition scores (BCS) and Backfat thickness (BF) was measured on day 7 after farrowing and 21 days post-partum. No significant differences were observed between treatments neither for sows' average daily feed intake nor for BCS loss or BF loss during lactation. However sows fed the Trp supplemented diet apparently lost less BCS (5.4%) and less BF (10.0%) than sows fed the control diet. Piglets' body weight and piglets' average daily gain tended to be higher in sows fed the Trp supplemented diet than those fed the control diet (6.32 vs 5.25kg; $P=0.07$ and 0.262 vs 0.199 kg; $P=0.09$). It is concluded that tryptophan supplementation of sows' diets during lactation may improve litter performance without affecting sow reserves.

Keywords: *Lactating sow, Piglets, Tryptophan.*

EFFECTO DEL NIVEL PROTEICO DE LA DIETA Y DEL PLANO DE ALIMENTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL BALANCE DE NITRÓGENO DE LECHONES IBÉRICOS EN FASE DE CRÍA (10-25 KG PV)

Conde-Aguilera J.A., Aguinaga M.A., Aguilera J.F. y Nieto R.
Instituto de Nutrición Animal (IFNA), Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del jueves s/n, 18100 Armilla, Granada. alberto.conde@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Establecer una adecuada relación proteína: energía en la dieta del cerdo en crecimiento es fundamental para conseguir una óptima eficiencia productiva en el animal y, de esta forma, maximizar la formación de tejido muscular, a la par que reducir el vertido de nitrógeno al entorno. Esta relación está muy influenciada por el genotipo, debido al diferente potencial genético para la deposición de proteína que presentan las distintas razas porcinas. Para la raza Ibérica, de crecimiento lento y con marcado carácter lipogénico, el valor de esta relación es considerablemente inferior a los establecidos para genotipos mejorados, como hemos demostrado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en los que se define la óptima proporción entre ambas variables para los periodos de crecimiento (15-50 Kg de peso vivo (PV), 6,86 g proteína ideal digestible/MJ EM, Nieto et al., 2002) y crecimiento-cebo (50-100 Kg PV, 5,17 g proteína ideal digestible/MJ EM, Barea et al., 2007). El objetivo del presente trabajo es definir la óptima concentración proteica en la dieta para el periodo de cría del lechón Ibérico (10-25 Kg PV). Con ello pretendemos contribuir a la definición precisa de las necesidades nutricionales de esta raza en las distintas fases de su ciclo productivo. De este modo será posible diseñar la estrategia nutricional más adecuada a cada fase, y con ello, conseguir la máxima eficiencia de utilización de los nutrientes proporcionados por el alimento, a la vez que se minimiza el vertido de efluentes contaminantes al medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se ha llevado a cabo con 48 lechones Ibéricos puros, machos castrados, de la estirpe Silvela. Se ha empleado un diseño factorial 4 x 2: 4 concentraciones proteicas en la dieta (CP; 190, 170, 145 y 120 g proteína bruta (PB)/Kg materia seca (MS)) y 2 niveles de alimentación (NA; 95 y 70 % *ad libitum*), con un total de 6 animales por tratamiento, asignados al azar. Las 4 dietas experimentales, aproximadamente isoenergéticas (12,3-12,8 KJ EM/g MS), fueron elaboradas a partir de una mezcla de más alta CP, formulada con cebada, soja y harina de pescado, diluida con un componente carente de proteína, de modo que el perfil aminoacídico de la proteína dietética (similar al de la proteína ideal definida para genotipos convencionales, NRC, 1998) fue el mismo para todas las dietas. Los lechones se alojaron en parques individuales, en una sala con temperatura controlada ($26 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$). Se realizaron controles de peso semanales y se ajustó el nivel de ingestión al peso de cada lechón y al nivel de alimentación que le fue asignado. Los animales se alimentaron 2 veces al día (9:00 y 16:00 h) y dispusieron de agua a voluntad y, diariamente, se registró la cantidad de alimento no ingerida para aquellos lechones que no consumieron en su totalidad el alimento ofrecido. Los ensayos de digestibilidad y balance se realizaron a los 13 Kg PV en jaulas metabólicas especialmente diseñadas para lechones. Los animales permanecieron en las jaulas de dos a tres días antes del comienzo de los ensayos para asegurar su adaptación a las mismas. Se realizó diariamente la recogida de heces y orina durante 5 días. La orina se recogió sobre 50 ml de SO_4H_2 4M. Tras el registro de las cantidades excretadas diariamente de heces y orina y la toma de alícuotas representativas, éstas se congelaron a -20°C hasta su análisis. Finalizado el ensayo de balance y digestibilidad, los animales permanecieron en las condiciones especificadas anteriormente hasta alcanzar los 25 Kg PV. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se ha realizado con el programa SPSS para Windows versión 14.0 (SPSS; Inc., 2005). Se ha aplicado un análisis de varianza de dos vías, con CP y NA como factores principales y 6 animales por bloque. Se ha empleado el test de Tukey para la comparación de los valores medios de las variables ensayadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración proteica de la dieta no afectó significativamente a la cantidad total de alimento consumida ($P > 0,05$). La ingesta media registrada en los animales alimentados a $0,95 \times ad libitum$ fue 801 g MS/d. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en relación a la ganancia media diaria de peso (GMD), índice de transformación (IT) y la eficiencia de utilización del alimento, expresada como ganancia de peso/ ingesta de energía metabolizable (g /MJ IEM). La GMD se afectó de forma muy significativa por los factores CP y NA ($P < 0,001$). Los lechones que consumieron las dietas con 190 y 170 g PB/Kg MS crecieron a mayor velocidad que los alimentados con las que contenían 145 y 120 g PB/Kg MS (350-345 vs 314-297 g/d, respectivamente; $P < 0,05$). Los factores CP y NA también afectaron muy significativamente al índice de transformación y a la relación ganancia/IEM (g/MJ) ($P < 0,001$). Las dietas que contenían 190 y 170 g PB/Kg MS resultaron en índices de transformación más favorables que aquellas que aportaban 145 y 120 g PB/Kg MS (2,03-2,05 vs 2,29-2,41, respectivamente; $P < 0,05$) y dieron lugar a una eficiencia de transformación del alimento más elevada (39,5-39,8 vs 34,4-33,0 g/MJ IEM; $P < 0,05$). Todos estos parámetros productivos aumentaron significativamente al elevarse el plano de alimentación ($P < 0,001$). La interacción CP x NA no fue en ningún caso significativa.

En la Tabla 2 aparecen resultados obtenidos en el ensayo de digestibilidad y balance de nutrientes: retención diaria de nitrógeno (NR, g/d), eficiencia de utilización del nitrógeno ingerido (NR:NI) y eficiencia de utilización del nitrógeno digestible (NR:ND). Tanto el factor CP como el NA afectaron significativamente a todas las variables estudiadas ($P < 0,01$ a $P < 0,001$) sin que hubiese interacciones significativas entre ellos. La retención de N (g/d) fue significativamente inferior en los lechones que recibieron la dieta con menor concentración proteica (120 g PB/Kg MS) respecto a aquéllos alimentados con las otras tres concentraciones proteicas empleadas (4,37 vs 6,90-7,71 g N/d; $P < 0,05$). En cuanto a las relaciones NR:NI y NR:ND, ambas experimentaron un aumento progresivo al disminuir la concentración proteica de la dieta hasta alcanzar un máximo (0,592 y 0,781, respectivamente) con el tratamiento que proporcionó 145 g PB/Kg MS, para posteriormente disminuir de nuevo, de forma significativa, con el tratamiento de más baja concentración proteica ($P < 0,05$). Ambas eficiencias fueron significativamente superiores en los animales sometidos al nivel más alto de ingestión ($P < 0,01$).

Tabla 1. Efecto de la concentración proteica de la dieta (CP) y del nivel de alimentación (NA) sobre los parámetros productivos de lechones Ibéricos en fase de cría (10-25 Kg PV).

	GMD (g/d)	IT	Ganancia peso:IEM (g/MJ)
CP (g PB/Kg MS)			
190	350 ^a	2,03 ^a	39,5 ^a
170	345 ^a	2,05 ^a	39,8 ^a
145	314 ^b	2,29 ^b	34,3 ^b
120	297 ^b	2,41 ^b	33,0 ^b
e.e.	7,7	0,032	0,57
NA ($\times ad libitum$)			
0,95	391 ^a	2,32 ^a	38,3 ^a
0,70	262 ^b	2,06 ^b	35,1 ^b
e.e.	5,4	0,023	0,40
Significación estadística			
CP	***	***	***
NA	***	***	***
CP x NA	NS	NS	NS

GMD: ganancia media diaria; IT: índice de transformación; IEM: ingesta de energía metabolizable; PB: proteína bruta; MS: materia seca.

^{a,b,c} En cada columna, los valores medios con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,05$).

NS: no significativo ($P > 0,05$); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Estos resultados indican que el tratamiento que proporciona 170 g PB/Kg MS (equivalente a 9,20 g proteína digestible/MJ EM) aporta la mínima concentración proteica en la dieta con la que se obtienen los valores de crecimiento, eficiencia de transformación del alimento y retención de nitrógeno más favorables.

Tabla 2. Efecto de la concentración proteica de la dieta (CP) y del nivel de alimentación (NA) sobre la retención de nitrógeno de lechones Ibéricos en fase de cría (10-25 Kg PV).

	NR (g/d)	NR:NI	NR:ND
CP (g PB/kg MS)			
190	7,71 ^a	0,509 ^b	0,671 ^b
170	6,90 ^a	0,493 ^b	0,686 ^b
145	7,06 ^a	0,592 ^a	0,781 ^a
120	4,37 ^b	0,459 ^b	0,664 ^b
e.e.	0,316	0,0146	0,0141
NA (x <i>ad libitum</i>)			
0,95	7,97 ^a	0,536 ^a	0,723 ^a
0,70	5,05 ^b	0,490 ^b	0,678 ^b
e.e.	0,223	0,0105	0,0101
Significación estadística			
CP	***	***	***
NA	***	**	**
CP x NA	NS	NS	NS

NR: nitrógeno retenido; NI: nitrógeno ingerido; ND: nitrógeno digestible; PB: proteína bruta; MS: materia seca.

^{a,b,c} En cada columna, los valores medios con distinto superíndice difieren significativamente (P <0,05)

NS: no significativo (P >0,05); * P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

National Research Council. 1998. Natl. Acad. Press, Washington.

Barea, R., R. Nieto y Aguilera, J.F. 2007. Animal 1: 357-365.

Nieto, R., Miranda, A., García, M.A. y Aguilera, J.F. 2002. Br. J. Nutr. 88:39-49.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (ref. AGL2005-01625).

EFFECTS OF DIETARY PROTEIN CONTENT AND FEED INTAKE ON GROWTH AND NITROGEN RETENTION OF IBERIAN PIGLETS (10-25 kg BW)

ABSTRACT: An experiment was performed to investigate the effects of dietary protein content (DPC) and level of intake (LI) on the performance of Iberian piglets from shortly after weaning (10 kg) to 25 kg BW. The trial followed a 4 (DPC: 190, 170, 145 and 120 g CP/kg DM) x 2 (LI: 95 and 70% x *ad libitum*) factorial design with six replicates per combination of treatments (n = 48). Four approx. isoenergetic diets (12.3-12.8 kJ ME/g DM) were prepared by diluting the higher DPC with a protein-free diluting mixture. Pigs were fed in two daily equal meals and water was freely available. An N-balance trial was performed at approximately 13 kg BW. Average daily gain was higher in animals fed 190 and 170 g CP/kg DM than in the other two dietary treatments (350-345 vs 314-297 g/d respectively; P <0.05). Diets providing 190 and 170 g CP/kg MS resulted in higher feed conversion ratio and gain/IEM ratio (g/MJ EM) (P <0.05). Nitrogen retained was significantly lower with the diet containing 120 g PB/kg DM (P <0.05). Protein requirements for optimum growth and performance of Iberian piglets can be achieved with the treatment providing 170 g ideal CP/kg DM (9.20 g digestible protein/MJ ME).

Key words: dietary protein; feeding level; growth performance; Iberian piglets.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DEL CONSUMO DE PIENSO DE LECHONES IBÉRICOS DESTETADOS A DIFERENTES EDADES

Izquierdo, M., Bazán, J., Ayuso, D. y Paniagua, M.
Centro de Investigación La Orden, Junta de Extremadura. A-V, Km 372, Guadajira 06071, Badajoz. mercedes.izquierdo@juntaextremadura.net

INTRODUCCIÓN

Debido a que el desarrollo enzimático para la digestión del pienso no se completa hasta aproximadamente las 8 semanas de vida (Díaz et al., 2007), tradicionalmente los lechones se destetaban alrededor de las 6 semanas de edad (Caballero de la Calle et al., 2005), pero con los sistemas de paridera controlada, y el uso de piensos de mayor digestibilidad para lechones muchos destetes se realizan cercanos a los 21 d de edad, siendo muy importante el manejo en este tipo de destetes. El fuerte stress que sufre el lechón al destete (Ribot, 1996) por el cambio de proteína de la leche a proteína vegetal y los niveles mínimos de defensa inmunitaria a esta edad (Durán, 1990) contribuyen a que el lechón resulte muy susceptible a la hora de contraer enfermedades y fácilmente se producen diarreas, pérdidas de apetito y de peso (Armstrong y Clawson, 1980). Según algunos autores, estos problemas incrementan la mortalidad y producen un crecimiento más lento que se prolonga incluso durante la fase de cebo (Canibe, 2008). Pero también hay autores que afirman las ventajas sanitarias de un destete precoz (Daza et al., 1999) sin mencionar que se incrementa la eficacia reproductiva de la cerda (Canibe, 2008). No obstante, en cerdo ibérico no existe ningún estudio que evalúe las ventajas y desventajas de un destete precoz frente a otro más tardío. Por este motivo, se pretende evaluar tres tipos de destete (21, 31 y 41 d de edad) con el fin de determinar la edad más adecuada para el destete en esta raza.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una explotación porcina de dehesa perteneciente a la Junta de Extremadura. Se utilizaron 42 hembras gestantes con una edad de tres años, siendo este, su cuarto parto. Se eligió la paridera de otoño- invierno por ser la más fría y limitante para el crecimiento y supervivencia de los lechones y poder así inferir mejor los resultados obtenidos. Antes del parto, las hembras se asignaron completamente al azar a tres grupos de tratamiento que se diferenciaban en la edad a la que se iban a destetar los lechones (Grupo 1: destete a 21 d de edad, Grupo 2: destete a 31 d y Grupo 3: destete a 41 d). Se estudiaron un total de 208 lechones. Una semana antes de la fecha calculada para el comienzo de la paridera, las cerdas se introdujeron en la nave de partos, con una jaula en cada cubículo donde se ubica la cerda, un sistema de alimentación individual y una placa calefactora. La alimentación de las hembras se divide en dos raciones diarias de 2 Kg. cada una, dicho pienso tiene una composición de: 17% de proteína bruta (PB), 5% de materia grasa (MG), 5,4% de fibra bruta (FB), 6,90% de CB, 0,82% de Lisina (Lys) y Aditivos (vitaminas A, D y E, cobre y antioxidantes).

Hasta los 21 d de edad no se diferencian los tres grupos de tratamiento. La alimentación de los lechones se basó en leche materna y pienso lactante sin medicar constituido por: 15% PB, 4,7% MG, 3,5% FB, 7,30% CB, 1% Lys y Aditivos (vitaminas A, D y E, cobre, ácido láctico, fórmico y ortofosfórico, y antioxidantes). A los 15 d de edad del lechón se comienza a dar pienso lacteado, hasta el destete. El destete consiste en sacar a la madre del cubículo dejando en el los lechones. Así las camadas se mantienen en sus corrales individuales para evitar el estrés y poder medir los consumos de piensos por camada hasta los 41 d de edad. A los 50 d de media, se reagrupan los lechones en dos lotes homogéneos dependiendo de su peso y se llevan a 2 corrales de cebo.

Durante este período, se recogieron los datos reproductivos de cada hembra: los pesos de los lechones a diferentes edades (21, 31, 41 d) y una pesada posterior con un rango de edad entre 50 y 75 d, tipificando esta pesada a 70 d. Se calcularon las ganancias medias diarias de 21 a 31 d, de 21 a 41 d, de 31 a 41 d y de 41 a 70 d. Se recogieron además los

consumos de pienso por camada cada 5 d. Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS (2002), con dos procedimientos distintos. Para los datos relativos a la hembra, como son: el número de lechones nacidos totales, nacidos vivos y destetados y los consumos por lote, se utilizó un procedimiento de modelo lineal generalizado (GLM), y para los datos medidos en los lechones individualmente (pesos y ganancias), se utilizó un procedimiento de modelos mixtos, incluyendo la cerda como un efecto aleatorio, modelo más adecuado cuando hay medidas repetitivas (Littell et al., 1998). En ambos casos se compararon las medias de los tres grupos de destete.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se indica en la Tabla 1, no había diferencias significativas entre grupos ni en el número de lechones nacidos, ni destetados ni en el peso a 21 d. Lo que indica que no se ha producido ningún sesgo al ser los tres grupos homogéneos respecto a esos parámetros.

Tabla 1. Pesos y crecimientos de los lechones en los tres grupos de destete.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Nacidos Totales	9,85	9,74	9,66
Nacidos Vivos	8,35	7,69	8,20
Destetados	6,45	6,15	6,36
Peso 21 d	4,98	5,25	4,90
Peso a 31 d	5,4 ± 0,16 ^a	6,3 ± 0,16 ^b	6,6 ± 0,18 ^b
Peso a 41 d	6,94 ± 0,2 ^a	7,49 ± 0,2 ^b	8,21 ± 0,2 ^c
Peso a 70 d	17,9 ± 0,5	17,3 ± 0,5	17,8 ± 0,5
GMD1 (21 a 31)	0,05 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^b	0,170 ± 0,01 ^c
GMD2 (21-41)	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,5	0,16 ± 0,5 ^a
GMD3 (31 a 41)	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01 ^a
GMD4 (41-70)	0,38 ± 0,014 ^a	0,34 ± 0,013 ^b	0,33 ± 0,014 ^c
Consumo de pienso (Kg)	40,42 ± 2,7 ^a	27,11 ± 2,5 ^b	26,2 ± 2,8 ^b
Intervalo al parto siguiente	176,7 ± 2,6 ^a	171,7 ± 2,8 ^b	178,7 ± 2,8 ^a

^{a,b,c} Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas (P<0,05).

La Tabla 1 describe también los pesos y crecimientos de los lechones. A los 30 d, el peso de los lechones destetados a 21 d es menor que el de los otros grupos, ya que están recién destetados (Canibe, 2008). A los 41 d el peso de los lechones destetados a los 21 d también es menor que el de los destetados a 31 y 41 d, siendo los destetados a 31d también menor que los destetados a 41 d. Sin embargo a los 70 d no aparecen diferencias significativas en los tres grupos. En relación a las GMD, se observa claramente que los lechones destetados a 21 d tienen una GMD1 muy pequeña por estar recién destetados, la GMD3 es mayor en los destetados a 41 d por estar aun con las madres, e igual para los otros dos grupos ya destetados. El crecimiento entre 31 y 41 d de los de los destetados a 31 d no decrece tanto por el efecto del destete como ocurrió en los destetados a 21 d ya que habían tenido acceso a una tolva desde los 21 a los 31 d, preparando así su intestino para el destete. La GMD4 es mayor en los destetados a 21 d por estar ya acostumbrados al pienso. El consumo de pienso es mayor en el grupo destetado a 21 d como se esperaba. Sin embargo, no hay diferencias entre los otros dos grupos, lo que nos indica que los lechones destetados a 41 d consumen el mismo pienso que los destetados a 31 d a pesar de estar con las madres más tiempo.

Los consumos de pienso de los lechones en intervalos de 5 d, calculados desde el día 21 de edad hasta el día 41, se representan en la Figura 1. Respecto al consumo de pienso en los diferentes períodos se observa que los animales destetados a los 21 d consumen una mayor cantidad de pienso que los de los otros dos grupos y esta cantidad se incrementa con la edad del lechón. En un primer período de 10 d tras el primer destete (del 21 al 31 de edad) no hay diferencias significativas entre los dos lotes que permanecen con las madres.

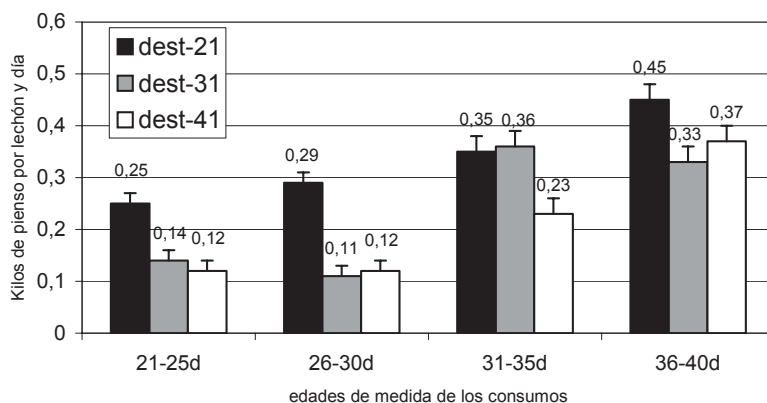


Figura 1. Medias de los consumos de pienso por lechón y día a un intervalo de edad de 5 d

Sin embargo, del día 36 al 40 en los grupos 2 y 3 no hay diferencias significativas en relación a la cantidad de pienso ingerida a pesar de estar el grupo 3 todavía con las madres. En conclusión, destetar a los 41 d no supone ningún beneficio ni en el consumo de pienso ni en crecimientos posteriores. Destetar a los 31 d reduce la cantidad de pienso consumida y proporciona mejores crecimientos hasta los 31 d. El destete a 21 d puede ser también viable en la raza porcina Ibérica, aunque exige una iniciación al pienso más temprana y manejo más riguroso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong y Clawson. 1980. J. Anim. Sci., 50: 377-384.
- Caballero de la Calle J.R., Serrano A., López Fuetes F. 2005. ITEA, 26 (1): 270-272.
- Canibe, 2008, Avances Tec. Por. 5, 32-50.
- Daza, A., Rioperez, J., Ovejero, I., Martín Rillo, S. y De Alba, C. 1999. ITEA, 20 (2): 765-766.
- Littell, R.C., Henry, P.R. y Ammerman, C.B. 1998. J. Anim. Sci., 76:1216-31.
- Riopérez, J. y Rodríguez, M.L. 2002. Mundo Ganadero, 143: 46-50.
- Ribot, A. 1996. Zootecnia: BPA. Tomo VI: 169-176. Mundi-Prensa, Madrid.

Agradecimientos: Plan regional de investigación I+D+i, Junta Extremadura.

GROWTH AND FEED CONSUMPTION EVALUATION OF IBERIAN PIGS WEANED AT THREE DIFFERENT AGES

ABSTRACT: Feed consumption (FC), average daily gain (ADG) and individual body weight at different ages of 208 Iberian piglets weaned at 21-, 31-, and 41-days of age were evaluated from winter parity in a research farm. FC was larger for animals weaned at 21 days of age than for the other two groups. However, there were not differences in FC between piglets weaned at 31 and 41 days of age. ADG and weigh at 21, 31, and 41 days were larger for piglets weaned at 31 and 41 days than for those weaned at 21 days, but ADG from 41 to 70 days and 70-day weight was similar for all groups. There is not any advantage for wean piglets at 41 days of age, and to wean piglets at 31 days seems to be more appropriate than wean them at 21 or 41 days. However, with a specific management piglets can be also weaned at 21 days without future problems.

Keywords: Iberian pigs, weaning, feed consumption, daily gain.

LA PULPA CÍTRICA COMO INGREDIENTE ALTERNATIVO EN ALIMENTACIÓN DE CERDOS PESADOS: RESULTADOS PRELIMINARES

Cerisuelo, A.¹, Moset, V.¹, Olivas, I.¹, Villagrà, A.¹, Piquer, O.², Fernández, C.³, Torres, A.³, Gasa, J.⁴ y Lainez, M.¹

¹Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA), Segorbe, Castellón. cerisuelo_alb@gva.es. ²Departamento de Producción Animal, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, Valencia. ³Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia (UPV). ⁴Grupo de Nutrición, manejo y bienestar animal, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

A raíz de la notable subida de precio que han experimentado las materias primas convencionales se están dedicando grandes esfuerzos a la búsqueda de materias primas alternativas en alimentación animal. La Comunidad Valenciana es una región típicamente cítrica con una producción de entre 3,0 y 3,9 millones de toneladas al año (CAPA, 2006). Como consecuencia de esta producción, se generan gran cantidad de excedentes y residuos (subproductos cítricos) que provocan serios problemas ecológicos-ambientales. Estos son susceptibles de ser utilizados en alimentación animal a precios competitivos. El más abundante es la pulpa cítrica (PC) proveniente de la industria de fabricación de zumos. Ésta se utiliza habitualmente en rumiantes, sin embargo, la cabaña porcina en la Comunidad Valenciana es la más importante en cuanto a recursos ganaderos (hasta un 68%), por lo que su uso en alimentación porcina podría suponer un avance en la eliminación de los residuos. En cerdos jóvenes (44 kg) niveles de un 10% de inclusión en seco dieron lugar a menores crecimientos durante la fase de engorde (O'Sullivan et al., 2003). Sin embargo, estudios recientes realizados en el IVIA indican que, tras un periodo de adaptación de entre 3 y 4 semanas, animales alimentados con un 10% de PC ensilada durante la fase final del cebo son capaces de igualar su ingestión en materia seca (MS) y la ganancia de peso a la de los cerdos alimentados con un pienso comercial (Cerisuelo et al., 2009). A partir de estos resultados se planteó un estudio para evaluar el valor nutritivo y grado de utilización de la PC en cerdos de cebo a pesos elevados (110-120 kg) y sus efectos sobre el patrón de excreción de nitrógeno a nivel urinario y fecal, microbiología intestinal y el rendimiento en matadero. En el presente documento se mostrarán los resultados preliminares de este estudio con respecto a la microbiología intestinal, características de las heces y rendimiento en matadero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 20 machos enteros y 20 hembras de $85,3 \pm 5,05$ kg de peso vivo que fueron alojados individualmente en 3 salas de la Unidad de cebo del Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA). Los animales se distribuyeron en 4 tratamientos dependiendo del nivel de PC ensilada en la dieta, **T0**: 0%, **T5**: 5%, **T10**: 10% y **T15**: 15% de inclusión. Los piensos experimentales fueron formulados para ser isoenergéticos e isoprotéicos (3,4-3,5 Mcal EM/kg MS; 1,09-1,10% en MS). Los animales se sometieron a un periodo de adaptación de 5 semanas y fueron alimentados de forma restringida de manera que todos los grupos recibieran la misma cantidad expresada en MS (2,70 kg MS/d; 2,5 veces mantenimiento; NRC, 1998). El ensilado de pulpa cítrica se analizó químicamente para MS, fibra (FB, FND y FAD), proteína bruta (PB), grasa bruta (GB) y azúcares solubles totales (AOAC, 1991; Van soest et al., 1991).

Los animales se pesaron al empezar la adaptación y semanalmente hasta el final de la prueba. A lo largo del estudio se realizaron de tres controles microbiológicos: previo al comienzo del periodo de adaptación, tras dos semanas de adaptación y al final del periodo experimental. Se recogieron muestras de heces directamente del recto de 8 animales por tratamiento y tras la preparación de diluciones seriadas (1:10), éstas se sembraron en medios de cultivo específicos para el aislamiento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae spp* (McConkey) y *Lactobacillus spp* (MRS). Tras las 4 semanas de adaptación a los piensos experimentales ($119,3 \pm 7,80$ kg de peso vivo) se realizó una recogida total de heces durante tres días consecutivos en los machos utilizando la

metodología de las “velcro bags” (Van Kleef et al., 1994). El total de heces recogidas diariamente se homogeneizó y congeló a -20°C hasta su posterior análisis. En las heces se determinó el pH y el contenido en humedad (70°C/48h). Los animales se alimentaron con los piensos experimentales hasta el sacrificio (125,2 ± 7,6 kg de peso vivo). En matadero se registraron los pesos canal de los animales y el espesor de grasa a nivel del músculo *gluteus medius*. Los resultados microbiológicos se analizaron mediante un análisis de medidas repetidas (PROC MIXED de SAS®). Las características de las heces y la canal se evaluaron mediante un análisis ANOVA de una vía (PROC GLM de SAS®).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La PC es un ingrediente con un bajo porcentaje de MS (15,5%), un elevado contenido en fibra (FB: 20,7%; FND: 30,1%; FAD: 19,8%), un bajo contenido en PB y GB (9% y 3,17%, respectivamente) y un contenido en azúcares solubles de 121,8 g/kg. Su inclusión en la dieta necesita de una suplementación con proteína y lisina para equilibrar fórmulas. En las Figuras 1 y 2 se presentan los resultados de la evolución de las poblaciones microbianas estudiadas en heces. La inclusión de niveles crecientes de PC en la dieta dio lugar a una disminución de los recuentos de enterobacterias, pero también a una disminución de los lactobacilos ($P<0,01$). Como resultado, la ratio lactobacilos:enterobacterias no se vio afectado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente por este mismo grupo de investigación (Cerisuelo et al., 2009). La PC presenta un elevado contenido en polisacáridos no amiláceos fácilmente fermentables en forma de carbohidratos solubles y pectinas. La inclusión de ingredientes con altos niveles de fibra fácilmente fermentable en la dieta ha sido relacionada con la inhibición del crecimiento de algunos patógenos intestinales como *E. coli*, en favor de otras especies bacterianas como las bifidobacterias (Williams et al., 2001; Bikker et al., 2006). Esto es debido a que este tipo de fibra es capaz de ser fermentada por los microorganismos intestinales y favorecer el crecimiento de poblaciones beneficiosas a nivel intestinal. Como resultado de esta fermentación generalmente se observa un incremento de los ácidos grasos volátiles que, en ocasiones, puede verse reflejado en una disminución del pH intestinal (Williams et al., 2001).

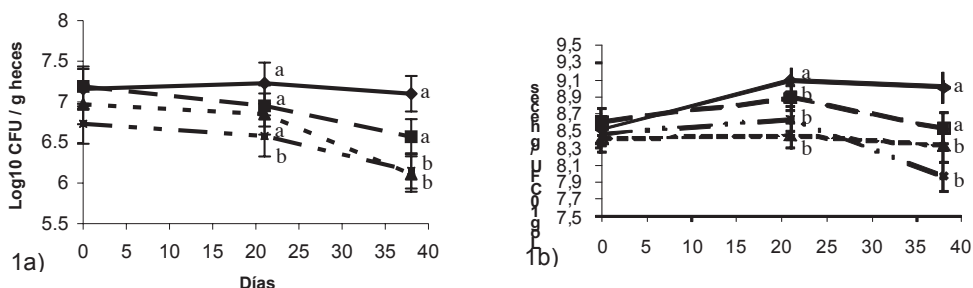


Figura 1. Evolución de las poblaciones de *Enterobacterias* (1a) y *Lactobacillus* (1b) en heces. Diferentes letras significan $P<0,05$ (T0: ———; T5: - - - -; T10:; T15: - . . -).

En la Tabla 1 se muestran los resultados relativos a la producción de heces y pH donde se observa una ligera disminución del pH en el grupo T15, aunque no estadísticamente significativa. En este sentido, Canh et al. (1997) hallaron valores inferiores de pH en heces de cerdos de cebo alimentados con 31,18% de pulpa de remolacha. En cuanto a la MS de las heces, en el presente estudio se observa una ligera disminución a medida que aumenta el nivel de PC en la dieta ($P=0,059$). De igual manera, Canh et al. (1997) obtuvieron mayores valores de humedad en heces de cerdos alimentados con niveles elevados de carbohidratos fácilmente fermentables. Por tanto, parece que la inclusión de PC a niveles de un 10-15% en la dieta da lugar a un blandeo de las heces. Con respecto a los rendimientos en matadero, los animales alimentados con un mayor nivel de PC (T15) presentaron menores rendimientos de canal al sacrificio ($P<0,05$). No hubo diferencias en cuanto a

profundidad de grasa dorsal a nivel del músculo *gluteus medius*. Hay evidencias en la literatura que muestran que alimentar con dietas fibrosas puede disminuir el rendimiento de la canal debido a un incremento del llenado del tracto. Sin embargo, en este estudio se practicó un ayuno de 24 horas pre-mortem por lo que es improbable que el tracto intestinal tuviera contenido. También se habla de un efecto trófico de la fibra sobre la mucosa intestinal (Pluske et al., 1998), que podría haber sido la causa de esta disminución del rendimiento de la canal en este estudio.

Tabla 1. Ingestión, características de las heces y rendimiento en matadero.

Tratamiento	T0	T5	T10	T15	e.e.	P-valor
Ingestión (kg MF/día)	3,00	3,87	5,19	5,46	-	-
Producción de heces (kg MF/día)	2,14	1,92	2,14	2,22	0,185	0,625
MS heces, %	29,0 ^a	29,1 ^a	27,6 ^{ab}	26,2 ^b	0,80	0,059
pH heces	6,47	6,50	6,56	6,32	0,101	0,409
Peso vivo inicial, kg	91,2	91,6	91,0	92,3	1,99	0,972
Peso vivo final, kg	125,9	123,9	124,6	126,4	2,48	0,877
Rendimiento canal, %	74,6 ^a	74,0 ^a	73,8 ^{ab}	72,6 ^b	0,518	0,020
Grasa <i>gluteus medius</i> , mm	9,6	12,6	12,6	10,0	1,51	0,280

En conclusión, la inclusión de PC en la dieta de cerdos de engorde es capaz de modular la microbiología intestinal hacia un menor recuento de Enterobacterias y Lactobacillus. Sin embargo, ésta disminuye la consistencia de las heces (15%) y el rendimiento de la canal en matadero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. 1991. Official Methods of Analysis (16^a ed.), Washington (EEUU).
- Bikker, P., Dirkwager, A., Fledderus, J., Trevisi, P., le Huërrou-Luron, I., Lallès, J. P., Awati, A. 2007. Livest Sci 108(1/3):194-197.
- Canh, T.T., Verstegen, M.W.A., Aarnink, A.J.A., Schrama, J.W. 1997. J Anim Sci 75:700-706.
- CAPA www.agricultura.gva.es/publicaciones/revistasint
- Cerisuelo, A., Castelló, L., Mosest.V., Martínez,M., Hernández, P., Piquer, O., Gómez, E., Gasa, J., Lainez, M. 2009. XI International Symposium on Digestive Physiology of Pigs. Montbrío del Camp 20th-22nd May 2009.
- O'Sullivan, T.C., Lynch, P.B., Morrissey, P.A., O'Grady, J.F. 2003. Ir J Agr Food Res 42:243-253.
- Pluske, J.R., Durmick, Z., Pethick, D.W., Mullan, B.P., Hampson, D.J. 1998. J Nutr 128(10):1737-1744.
- van Kleef, D.J., Deuring, K., van Leeuwen, P. 1994. Lab Anim 28:78-79.
- van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. J Dairy Sci 74:3583-3597.
- Williams, B. A., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S. 2001. Nutr Res Rev 14(2): 207-2007.

CITRUS PULP AS AN ALTERNATIVE FEEDSTUFF FOR HEAVY WEIGHT PIGS FEEDING: PRELIMINARY RESULTS

ABSTRACT: Nutritive value of ensiled citrus pulp on finishing pigs is being evaluated. Forty pigs (20 males and 20 females) of 85.3 ± 5.05 kg body weight were allocated into 4 treatments based on different citrus pulp inclusion levels in the diet: **T0:** 0, **T5:** 50, **T10:** 100 and **T15:** 150 g per kg on a dry-matter (DM) basis. Experimental diets were formulated to be isoenergetic and isoproteic (3.4-3.5 Mcal ME/kgDM; 1.09-1.10% in DM). The feeding level was 2.5 times energy required for maintenance. The pigs were allowed a 5-week adaptation period. Then, total faeces from males were collected on three successive days and analysed for DM and pH. Body weight was recorded weekly and intestinal microflora was investigated from both, males and females, during the adaptation period and at the end of the study (8 pigs/treatment). At slaughter, carcass weight and backfat at *gluteus medius* was recorded. Pigs offered the highest levels of citrus pulp in the diet (10 and 15%) reduced significantly *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillus* population (P<0.01), and faeces DM content (T15; P<0.01). No differences were detected in backfat at *gluteus medius* muscle but carcass yield decreased with increasing citrus pulp level in the diet. It was concluded that inclusion of citrus pulp up to 10-15% in the diet of growing pigs can modulate microbiota but lead to less firm faeces and lower carcass yield.

Keywords: citrus pulp, finisher pigs, gut microbiology

EFFECTO DE LA BETAÍNA, EL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO, O AMBOS, SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA INTRAMUSCULAR DE JAMÓN Y PALETA EN CERDOS IBÉRICOS EN CRECIMIENTO

Rodríguez-López, J.M., González-Valero, L., Rojas-Cano, M.L., Lachica, M., Lara, L. y Fernández-Figares, I.

Unidad de Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Camino del Jueves s/n. Armilla, 18100 Granada. ifigares@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La suplementación de dietas de cerdo Ibérico en crecimiento con betaína y ácido linoleico conjugado (CLA) de forma conjunta produjo un efecto sinérgico obteniéndose canales con mayor contenido en proteína y menor de grasa (Fernández-Figares et al., 2008a). Sabemos igualmente que el perfil de ácidos grasos de distintos depósitos grasos (grasa subcutánea, grasa perirrenal, grasa intramuscular en músculos *Semitendinosus* y *Biceps femoris*) se afectó por la suplementación con betaína y CLA (Fernández-Figares et al., 2008b). El fin del presente trabajo es determinar la influencia de la betaína y el CLA en la composición en ácidos grasos de la grasa intramuscular de las piezas nobles, jamón y paleta, en cerdos Ibéricos en crecimiento (20-50 kg) alimentados con estos modificadores metabólicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 20 cerdas Ibéricas puras de la estirpe Silvela. Antes del comienzo del experimento, las cerdas estaban estabuladas en grupo y con acceso libre a una dieta control, desde los 16 a los 20 Kg de peso vivo (PV). Al alcanzar dicho peso se alojaron en parques individuales de 2 m² situados en una nave con temperatura y humedad controladas y se les asignó al azar una de las cuatro dietas experimentales ofrecidas al 95% de *ad libitum* en función de su PV. Los tratamientos consistieron en una dieta control (cebada grano y harina de torta de soja como fuentes proteicas; proteína bruta (PB) 116 g/Kg; lisina 8,1 g/Kg; energía metabolizable (EM) 15,1 MJ/Kg MS) y ésta adicionada de 0,5% de betaína, 1% de CLA (60% de isómeros *cis*-9, *trans*-11 y resto *trans*-10, *cis*-12- CLA en forma de ésteres metílicos) o de ambos compuestos. Las dietas control y adicionada de betaína tenían aceite de girasol en lugar de CLA. La proteína se ajustó para optimizar la deposición proteica en el cerdo Ibérico y el resto de nutrientes estaba ajustado a sus necesidades. Alcanzados los 50 Kg PV, los animales fueron sacrificados previo aturdimiento mediante electronarcosis. Se realizó el despiece sobre la semicanal izquierda (Vílchez Campillos, 2004) para obtener jamones y paletas, que se conservaron a -20°C hasta su análisis posterior. Los lípidos se extrajeron siguiendo el método de Folch modificado (Folch et al., 1957), usando cloroformo/metanol (2:1) + BHT al 0,05%. La metilación de los ácidos grasos para su detección por cromatografía gaseosa se realizó según el método de Kramer y Zhou (2001) modificado, en el que se realiza una metilación en medio básico (metanol y sosa) y otra en medio ácido (metanol y ácido clorhídrico) de forma consecutiva, sin calentar por encima de 50 °C para evitar la isomerización de los ácidos grasos insaturados. Como estándar interno se usó el ácido nonadecanoico (C19:0). Los ésteres metílicos son inyectados y cuantificados en un cromatógrafo de gases con detector por ionización de llama (Perkin Elmer, Autosystem Gas Chromatograph, Ma. USA) usando una columna Teknokroma, phase: TR-CN100 (60m x 0,25 mm x 0,20 µm). Los ácidos grasos se cuantificaron usando una recta de calibrado multinivel para cada ácido graso individual y se expresaron como µg de ácido graso/g sustancia liofilizada. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando como efectos principales la pieza (jamón o paleta) y el tratamiento (Control, Betaína, CLA, CLA+Betaína) en un diseño completamente al azar. El nivel de significación se fijó en P<0,05 y las diferencias entre medias se determinaron usando el test de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del perfil de ácidos grasos individuales en jamón y paleta están en la Tabla 1. La interacción Pieza x Tratamiento no fue significativa en todos los casos, por lo que se muestran las medias de los efectos principales. El jamón presentó mayor cantidad de ácidos grasos que la paleta, excepto para el caso del linoléico, araquídico, araquidónico y ambos isómeros del CLA analizados en los que no hubo diferencias significativas. La adición de CLA a las dietas produjo una cantidad de oleico y mayor de mirístico, palmítico, palmitoleico y los dos isómeros del CLA. Si además del CLA se adiciona betaína a la dieta, encontramos menor cantidad de oleico, linoleico, araquidónico y mayor cantidad de mirístico y los dos isómeros del CLA que en el control. La betaína de forma aislada no produjo ningún efecto significativo sobre el perfil de ácidos grasos al compararlo frente al control. Las concentraciones de esteárico y linoléico no se afectaron por los tratamientos.

En trabajos anteriores en cerdo Ibérico (Fernández-Fígares et al., 2008b) la incorporación de CLA o de CLA+Betaína produjo una disminución de la proporción de ácidos grasos insaturados y un aumento de los saturados en *Biceps femoris*, *Semitendinosus* y grasa subcutánea; y la adición de betaína tampoco produjo cambios en el perfil de ácidos grasos de los músculos *Biceps femoris* y *Semitendinosus*, aunque aumentó la proporción de ácidos grasos insaturados en grasa subcutánea. En cerdos de razas mejoradas está descrito que el CLA aumenta la proporción de ácidos grasos saturados en la canal de cerdos (Ostrowska et al., 1999), siendo el mecanismo de acción propuesto, la disminución de la expresión de la enzima estearoil-CoA desaturasa (Demaree et al., 2002), encargada de la conversión de ácidos grasos saturados a insaturados.

La adición de CLA o CLA+Betaína a la dieta del cerdo Ibérico produce un empeoramiento del perfil de ácidos grasos, haciéndolo más saturado. Su uso estaría recomendado sólo durante la fase temprana de crecimiento, dando así tiempo hasta el momento del sacrificio a que se produzca una renovación de la grasa, de forma que llegado ese momento el perfil de la misma fuera más saludable.

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos en grasa intramuscular de jamón y paleta de cerdas Ibéricas de 50 kg alimentadas con dietas suplementadas o no con 0,5% betaína, 1,0% CLA o ambos (n=5/grupo).

Ácido Graso	Pieza			Tratamiento				e.e.
	Jamón	Paleta	e.e.	Control	Betaína	CLA	CLA+Betaína	
Mirístico (C14:0)	0,67 ^a	0,47 ^b	0,019	0,41 ^a	0,38 ^a	0,80 ^b	0,69 ^c	0,028
Palmítico (C16:0)	9,47 ^a	7,47 ^b	0,29	8,02 ^{ab}	7,38 ^b	9,64 ^d	8,85 ^{acd}	0,42
Esteárico (C18:0)	3,67 ^a	3,16 ^b	0,12	3,48 ^a	3,14 ^a	3,70 ^a	3,34 ^a	0,16
Araquídico (C20:0)	0,05 ^a	0,05 ^a	0,002	0,05 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a	0,003
Palmitoleico (C16:1)	2,29 ^a	1,69 ^b	0,083	1,73 ^a	1,96 ^{ab}	2,27 ^b	1,99 ^{ab}	0,12
Oleico (C18:1)	20,7 ^a	15,8 ^b	0,61	20,8 ^a	21,1 ^a	16,4 ^b	14,7 ^b	0,85
Linoleico (C18:2)	1,97 ^a	1,66 ^b	0,064	1,93 ^a	1,94 ^{ab}	1,79 ^{ab}	1,60 ^b	0,086
CLA 9c, 11t (C18:2)	0,14 ^a	0,13 ^a	0,007	0,06 ^a	0,05 ^a	0,24 ^b	0,21 ^c	0,010
CLA 10t, 12c (C18:2)	0,05 ^a	0,04 ^a	0,004	0,02 ^a	0,03 ^a	0,07 ^b	0,06 ^b	0,004
Linoléico (C18:3)	0,08 ^a	0,08 ^a	0,004	0,08 ^a	0,07 ^a	0,09 ^a	0,08 ^a	0,005
Araquidónico (C20:4)	0,20 ^a	0,20 ^a	0,011	0,23 ^a	0,21 ^{ab}	0,19 ^{ac}	0,15 ^c	0,015

^{a,b} Dentro de cada tratamiento, medias con distinto superíndice difieren significativamente (P<0,05).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Demaree, S.R., Gilbert, C.D., Mersmann, H.J. y Smith, S.B. 2002. J. Nutr. 132:3272-3279.
- Fernández-Fígares, I., Conde-Aguilera, J.A., Nieto, R., Lachica, M. y Aguilera, J.F. 2008a. J. Anim. Sci. 86: 102-111.
- Fernández-Fígares, I., Rodríguez-López, J.M., González-Valero, L., Nieto, R., Lachica, M. y Aguilera, J.F. 2008b. J. Anim. Sci. 86, E-Suppl. 2: 37.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. 1957. J. Biol. Chem. 226: 497.
- Kramer, J.K.G. y Zhou, J. 2001. Eur. J. Lipid Sci. Tech. 103: 594-600.
- Ostrowska, E., Muralitharan, M., Cross, R.F., Bauman, D.E. y Dunshea, F.R. 1999. J. Nutr. 129:2037-2042.
- Vílchez Campillos, M.A. 2004. Trabajo profesional fin de carrera, Universidad de Córdoba.

Agradecimientos: Este proyecto ha sido cofinanciado por los proyectos AGL2002-01562 y 2006 4 OI 025.

EFFECT OF BETAINE, CLA OR BOTH ON INTRAMUSCULAR FATTY ACID PROFILE OF HAMS AND SHOULDER OF GROWING IBERIAN PIGS

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the effects that betaine (BET) and CLA on intramuscular fatty acid profile on hams and shoulders of Iberian growing pigs (20-50 kg BW). Gilts (n=20) were fed control, 1% CLA, 0.5% BET or 1% CLA+0.5% BET isoenergetic diets at 95% of *ad libitum* intake. Feed intake was adjusted weekly according to BW. At 50 kg, pigs were electro-stunned and exsanguinated. Carcasses were chilled for 24 h and left half carcasses frozen at -20 °C until further analysis. Hams and shoulders were separated from the carcass and carefully dissected into skin, bone, lean tissue and fat tissue. Greater amount of fatty acids were found in hams compared to shoulders except for CLA, linoleic, araquidic and araquidonic acids. CLA increased both CLA isomers, miristic, palmitic, and palmitoleic acids while decreased oleic acid. The addition of CLA+BET decreased oleic, linoleic, araquidonic and increased CLA isomers and miristic acids. Betaine alone had no effect when compared with control and estearic and linolenic acids were not affected by any treatment. A more saturated fatty acid profile was found in hams and shoulders of Iberian pigs fed with CLA or a combination of CLA and BET.

Keywords: Betaine, CLA, Iberian pigs, fatty acids.

EFFECTO DE LA BETAÍNA Y EL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO SOBRE LOS DIVERSOS CORTES Y TEJIDOS DE LA CANAL DE CERDOS IBÉRICOS. ANÁLISIS ALOMÉTRICO

Rojas-Cano, M.L., Lara, L., Lachica, M. y Fernández-Fígares, I.
Unidad de Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Camino del Jueves s/n.
Armillá, 18100 Granada. ifigares@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

En sentido amplio, se denomina modificador metabólico a cualquier suplemento u hormona que tiene un efecto sobre la ingesta de nutrientes o bien sobre la partición de los mismos. Se busca que mejoren la eficiencia productiva de los animales en crecimiento pudiendo modificar la composición de la canal. Algunos estudios realizados indican que la inclusión de betaína en la dieta provoca cambios en la composición de la canal debido a una reducción del contenido en grasa (Fernández-Fígares et al., 2002) y un aumento en el porcentaje de tejido magro (Wang y Xu, 1999). El ácido linoleico conjugado (CLA) puede reducir la grasa de la canal (Thiel-Cooper et al., 2001), aumentar el magro (Dugan et al., 1997) y mejorar la eficiencia bruta (Ostrowska et al., 1999). El objetivo de este estudio ha sido evaluar los efectos de dos modificadores metabólicos: betaína y CLA, sobre el crecimiento y desarrollo de los diversos cortes y tejidos de la canal de cerdos Ibéricos en su fase de crecimiento (de 20-50 Kg de peso vivo (PV)).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 25 cerdas Ibéricas puras de la estirpe Silvela, alojadas en grupo y alimentadas *ad libitum* con una dieta basal, hasta que alcanzaron el peso de entrada en el ensayo de crecimiento, 20 ± 1 Kg de PV, momento en el que cinco cerdas fueron sacrificadas y las canales despiezadas y diseccionadas para la obtención de los puntos iniciales en las ecuaciones alométricas. Los 20 animales restantes se alojaron individualmente y se asignaron aleatoriamente a cada uno de los cuatro tratamientos experimentales. Éstos consistieron en la incorporación de 0,5% de betaína, 1% de CLA ó 0,5% de betaína + 1% CLA a la dieta basal, que se utilizó como control (12,0% PB, 0,81% Lys, y 14,8 MJ de EM/Kg de MS). El nivel de alimentación utilizado fue del 95% *ad libitum*, calculado en función del PV, siguiendo una regresión lineal descrita por Nieto et al. (2001) para el cerdo Ibérico. Alcanzado el peso estimado para el final de ensayo ($51,1 \pm 0,85$ Kg PV), los animales fueron sacrificados previo aturdimiento mediante electronarcosis. Las semicanales izquierdas fueron despiezadas (Vílchez campillos, 2004) en los siguientes cortes: grasa de riñonada, tocino dorsal, panceta (piezas con predominio de componente graso), solomillo, cabeza de magro, lomo (piezas con predominio de componente magro), espinazo, costillar (piezas con predominio de componente óseo), jamón sin perfilar y paleta sin perfilar (piezas mixtas). En el jamón y la paleta, una vez perfilados, se realizó la disección tisular para la obtención de los distintos tejidos que la conforman: piel, grasa, magro y hueso.

El modelo matemático aplicado de forma generalizada para medir el crecimiento y desarrollo del animal es la ecuación alométrica descrita por Huxley (1932), que permite medir el crecimiento relativo de dos componentes corporales, siendo uno de ellos el peso del organismo completo, total corporal o total de referencia y el otro una fracción de éste (tejido, órgano, región o componente). Esta ecuación se hace lineal tomando su forma logarítmica:

$$\log Y = \log a + b \log X$$

En donde Y es el peso de un órgano, tejido o región anatómica; X es el peso del cuerpo, tejido total o región anatómica con la cual se compara el crecimiento de Y, y b es una constante denominada *coeficiente alométrico*, que es la relación entre la velocidad relativa de crecimiento de una parte del animal respecto a la del cuerpo u otra parte del mismo (De Pedro, 1987). Si $b=1$, isometría (ambos componentes crecen a la misma velocidad); si $b>1$,

alometría positiva (Y crece a mayor velocidad que X) y si $b < 1$, alometría negativa (Y crece a menor velocidad que X).

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos, usando el procedimiento GLM (Modelo Lineal General) mediante el software estadístico SPSS (SPSS 15.0). La diferencia entre los tratamientos se estableció mediante el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No hemos encontrado trabajos en la literatura donde se estudie el efecto de la betaína y el CLA sobre el desarrollo relativo de los distintos cortes y tejidos de la canal. En la tabla 1 se observa que la adición de betaína a la dieta provoca un aumento significativo ($P < 0,05$) del coeficiente alométrico en el espinazo, lo que indica una maduración más tardía, creciendo proporcionalmente más rápido que el control y dando lugar a un mayor desarrollo en el rendimiento de este corte. Otros autores han encontrado igualmente que la betaína puede aumentar la longitud de la canal (Matthews et al., 1998). Por otro lado, en los cortes con predominio de componente graso, la adición de betaína tiende a acelerar el desarrollo de las piezas (disminución del valor del coeficiente alométrico), dando lugar a una maduración más precoz del componente, siendo significativo ($P < 0,05$) para la panceta. Tanto en el solomillo como en el jamón perfilado de animales alimentados con dietas que contienen CLA + betaína, el valor del coeficiente alométrico aumenta significativamente ($P < 0,05$), lo que indica un desarrollo más tardío de estos cortes. Sin embargo, la adición de ambos modificadores metabólicos a la dieta provoca una disminución significativa ($P < 0,05$) del valor del coeficiente alométrico en la grasa de riñonada, provocando una aceleración en el desarrollo de la grasa de riñonada.

Tabla 1. Coeficientes alométricos de crecimiento de los diferentes cortes y tejidos de cerdas Ibéricas de 50 Kg de peso vivo, alimentadas con dietas suplementadas o no con 0,5% betaína, 1,0% CLA o ambos ($n=5$ /grupo).

	Control		con betaína		con CLA		con CLA+betaína	
	$b \pm S_b$	R^2	$b \pm S_b$	R^2	$b \pm S_b$	R^2	$b \pm S_b$	R^2
Grasa riñonada	1,66 ^a ±0,106	0,976	1,52 ^{ab} ±0,094	0,978	1,50 ^{ab} ±0,151	0,942	1,40 ^b ±0,089	0,976
Solomillo	0,90 ^a ±0,104	0,926	1,01 ^{ab} ±0,062	0,978	1,02 ^{ab} ±0,060	0,979	1,05 ^b ±0,059	0,982
Costillar	0,97±0,069	0,970	0,98±0,049	0,985	1,02±0,074	0,970	1,03±0,046	0,988
Espinazo	0,75 ^a ±0,048	0,976	0,89 ^b ±0,071	0,963	0,77 ^{ab} ±0,073	0,949	0,87 ^{ab} ±0,050	0,981
Cabeza magro	0,93 ^{ab} ±0,094	0,942	1,08 ^b ±0,079	0,969	0,78 ^b ±0,120	0,877	1,03 ^a ±0,050	0,986
Lomo	0,91±0,085	0,950	0,93±0,061	0,975	0,94±0,047	0,985	0,95±0,031	0,994
Paleta								
sin perfilar	1,01 ^{ab} ±0,038	0,992	1,03 ^a ±0,024	0,997	0,98 ^b ±0,019	0,998	0,96 ^b ±0,018	0,998
perfilada	0,95±0,033	0,993	0,96±0,032	0,993	0,94±0,035	0,992	0,93±0,027	0,995
Piel	0,59±0,038	0,975	0,63±0,056	0,954	0,58±0,045	0,966	0,59±0,064	0,934
Hueso	0,63±0,011	0,998	0,63±0,031	0,986	0,59±0,022	0,992	0,61±0,037	0,979
Magro	0,83±0,017	0,997	0,84±0,019	0,997	0,83±0,022	0,996	0,87±0,017	0,998
Grasa	1,94±0,104	0,983	1,91±0,108	0,981	1,96±0,113	0,980	1,90±0,108	0,981
Jamón								
sin perfilar	0,95 ^{ab} ±0,013	0,999	0,93 ^a ±0,016	0,998	0,97 ^b ±0,015	0,998	0,96 ^b ±0,014	0,999
perfilado	0,93 ^{ab} ±0,013	0,999	0,94 ^{ab} ±0,018	0,998	0,96 ^{ab} ±0,015	0,998	0,96 ^b ±0,016	0,998
Piel	0,60±0,045	0,967	0,65±0,044	0,973	0,59±0,039	0,975	0,64±0,066	0,940
Hueso	0,59±0,018	0,994	0,58±0,023	0,991	0,55±0,043	0,965	0,54±0,023	0,990
Magro	0,86±0,019	0,997	0,87±0,011	0,999	0,87±0,019	0,997	0,89±0,019	0,997
Grasa	2,11±0,103	0,986	2,09±0,100	0,986	2,10±0,1093	0,984	2,05±0,108	0,984
Tocino dorsal	1,28 ^{ab} ±0,049	0,991	1,18 ^b ±0,080	0,973	1,34 ^b ±0,043	0,994	1,25 ^{ab} ±0,059	0,987
Panceta	1,18 ^a ±0,040	0,993	1,12 ^b ±0,028	0,996	1,19 ^a ±0,019	0,998	1,17 ^{ab} ±0,029	0,996

b: Coeficiente alométrico, ^{a,b} Para dietas y dentro de una misma pieza y/o tejido, los valores del coeficiente alométrico (b) afectados por distinto índice difieren significativamente ($P < 0,05$)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Pedro, E. 1987. Tesis doctoral. Universidad Córdoba.
- Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Schaefer, A. L. y Kramer J. K. G.. 1997. *Can. J. Anim. Sci.* 77:723–725.
- Fernández-Figares I., Wray-Cahen D., Steele N.C., Campbell R.G., Hall D.D., Virtanen E. y Caperna T.J. 2002. *J. Anim. Sci.* 80: 421-428.
- Huxley, J.S. 1932: 4-37. Methnen, Londres.
- Matthews, J. O., L. L. Southern, J. E. Pontif, A. D. Higbie, and T. D. Bidner. 1998. *J. Anim. Sci.* 76:2444–2455.
- Nieto, R., Lara, L., García, M.A., Gómez, F., Zalvide, M., Cruz, M., Pariente, J.M., Moreno, A., y Aguilera J.F. 2001. *Sólo Cerdo Ibérico* 6: 57-69.
- Ostrowska, E., M. Muralitharan, R. F. Cross, D. E. Baumann, F. R. Dunshea. 1999. *J. Nutr.* 129:2037–2042.
- Thiel-Cooper, R.L., J.R.F.C. Parrish, J.C. Sparks, B.R. Wiegand, and R.C. Ewan. 2001. *J. Anim. Sci.* 79: 1821-1828.
- Vilchez Campillos, M.A. 2004. Trabajo profesional fin de carrera, Universidad de Córdoba.
- Wang YZ y Xu ZR. 1999. *Journal of Zhejiang Agricultural University* 25, 281-285.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido cofinanciado por los proyectos AGL2002-01562 y 2006 4 OI 025.

EFFECT OF BETAINE AND CLA ON COMMERCIAL CUTS AND TISSUES IN IBERIAN PIG CARCASSES. ALLOMETRIC ANALYSIS

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the effects that betaine and CLA on growth and development of commercial cuts and tissues of Iberian growing pigs (20-50 kg BW) using allometry. Gilts (n=20) were fed control, 1% CLA (CLA-60), 0.5% BET or 1% CLA+0.5% BET isoenergetic diets from 20 to 50 kg BW. Animals were fed diets containing 120 g crude ideal protein, and 15.4 MJ ME /kg DM at 95% of *ad libitum* intake. Dietary treatments and individual pen locations were assigned at random to experimental gilts. Pigs were weighed and feed intake was adjusted weekly according to BW. An additional group of 5 pigs was slaughtered at the beginning of the experiment and the carcasses dissected to obtain the initial points of the allometric equations. At 50 kg BW, pigs were electro-stunned, exsanguinated and organs were removed. Carcasses were chilled for 24 h and left half carcasses were frozen at -20C until further dissection for the allometric analysis. Ham, shoulder, spinal cord, ribs, loin, sirloin, back fat, bacon and renal fat were separated from the carcass. Additionally, hams and shoulders were carefully dissected into skin, bone, lean tissue and fat tissue. Betaine increased ($P<0.05$) the allometric growth coefficient in the spinal cord, indicating later maturing nature, growing faster in relation to control pigs, while it was decreased for bacon ($P<0.05$). Nevertheless, the supplementation with betaine and CLA together, decreased renal fat allometric growth coefficient ($P<0.05$) while it was increased for sirloin ($P<0.05$). Betaine and CLA may change the pace of development of the commercial cuts in Iberian pigs. It seems like that there is an additive effect leading to an increase of lean tissues and a decrease of fat deposition.

Keywords: Allometry, betaine, CLA, Iberian pig.

EFFECTO DE LA BETAÍNA, EL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO O AMBOS SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA GRASA Y ÁCIDOS GRASOS EN CERDOS IBÉRICOS EN CRECIMIENTO

González-Valero, L., Rodríguez-López, J.M., Lachica, M. y Fernández-Fígares, I.
Unidad de Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Camino del Jueves s/n.
Armillá, 18100 Granada. ifigares@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La suplementación de dietas con betaína (BET) o ácido linoleico conjugado (CLA) en cerdos Ibéricos en crecimiento tuvo un efecto leve, parecido al de razas mejoradas, en parámetros de crecimiento, composición de la canal y deposición de nutrientes, pero al usarlos conjuntamente se produjo un efecto sinérgico obteniéndose canales con mayor contenido en proteína y menor de grasa (Fernández-Fígares et al., 2008a). Sabemos igualmente que la composición del perfil de ácidos grasos de distintos depósitos grasos (grasa subcutánea, grasa perirrenal, grasa intramuscular en músculos *Semitendinosus* y *Biceps femoris*) se afecta por la suplementación con betaína y CLA (Fernández-Fígares et al., 2008b). Así, la dieta adicionada de betaína aumentó los ácidos grasos monoinsaturados y disminuyó los ácidos grasos saturados en grasa subcutánea. Por otro lado, la incorporación de CLA o de BET+CLA produjo el efecto contrario tanto en la grasa intramuscular como en los demás depósitos grasos estudiados. Mediante un ensayo de digestibilidad y balance revelamos la ausencia de diferencias significativas en la digestibilidad aparente fecal de materia seca, materia orgánica, energía, nitrógeno y aminoácidos atribuibles a la incorporación a la dieta de betaína, CLA o ambos (Fernández-Fígares et al., 2008c). El fin del presente trabajo es determinar la influencia de la betaína y el CLA en la digestibilidad de grasa y ácidos grasos individuales en cerdos Ibéricos en crecimiento alimentados con estos modificadores metabólicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 20 cerdas Ibéricas puras de la estirpe Silvela. Antes del comienzo del experimento, las cerdas estaban estabuladas en grupo en parques y con acceso libre a una dieta control desde los 16 a los 20 Kg de peso vivo (PV). Al alcanzar este peso ($20,0 \pm 0,37$ Kg) se alojaron en parques individuales de 2 m² situados en una nave con temperatura y humedad controladas, y se les asignó al azar una de las cuatro dietas experimentales, ofrecidas al 95% *ad libitum* y en una sola toma (09.00h). Los tratamientos consistieron en una dieta control (cebada grano y harina de torta de soja como fuentes proteicas; Proteína bruta (PB) 116 g/Kg; lisina 8,1 g/Kg; energía metabolizable (EM) 15,1 MJ/Kg MS) y ésta adicionada de 0,5% de betaína (Betafin S1; cristalina, 96% pureza), 1% de CLA (60% de isómeros *cis*-9, *trans*-11 y resto *trans*-10, *cis*-12- CLA en forma de ésteres metílicos) o de ambos compuestos (BET+CLA). Las dietas control y BET contenían 1% de aceite de girasol en lugar de CLA. La proteína se ajustó para optimizar la deposición proteica en el cerdo Ibérico y el resto de nutrientes estaba ajustado a sus necesidades.

Cuando las cerdas alcanzaron los 30 Kg PV se realizó una prueba de balance en jaulas metabólicas. Se les colocó un catéter uretral para la recogida cuantitativa de orina. Los resultados de los análisis químicos realizados sobre alícuotas representativas del alimento ingerido y de las heces excretadas durante 4 días se utilizaron para calcular, en último término, la digestibilidad de nutrientes durante el periodo de balance. Aquí presentamos los datos relativos a la digestibilidad de la grasa bruta y ácidos grasos individuales. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su análisis posterior. Los lípidos se extrajeron mediante una modificación del método de Folch (Folch et al., 1957) usando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) adicionado de BHT (0,05%). Como estándar interno se usó el ácido nonadecanoico (C19:0). Los ésteres metílicos se prepararon usando metóxido sódico en metanol y fueron cuantificados mediante cromatografía gaseosa (Perkin Elmer, Autosystem

Gas Chromatograph, Ma. USA) usando un detector de ionización de llama y una columna capilar (60mx0,25mmx0,2µm). Los ácidos grasos se cuantificaron usando una recta de calibrado multinivel para cada ácido graso individual y se expresaron como µg de ácido graso/g sustancia liofilizada. El análisis estadístico consistió en ANOVA de una vía con un diseño completamente al azar. Cuando $P < 0,05$ se consideró que los tratamientos eran distintos significativamente, usándose el test de Duncan para comparar las medias entre sí.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En trabajos anteriores, mediante un ensayo de digestibilidad y balance, revelamos la ausencia de diferencias significativas en la digestibilidad aparente fecal de materia seca, materia orgánica, energía, nitrógeno y aminoácidos atribuibles a la incorporación a la dieta de betaína, CLA o ambos (Fernández-Figares et al., 2008b). Desconocemos la existencia de trabajos en los que haya sido evaluado el efecto de la betaína o el CLA sobre la digestibilidad de ácidos grasos en cerdos. En el presente trabajo, la betaína disminuyó la digestibilidad aparente total de los ácidos palmítico, esteárico y oleico respecto al control, sin tener efecto sobre la grasa total, el ácido oleico o el CLA. Øverland et al. (1999) no encontraron tampoco diferencias en digestibilidad aparente fecal de la grasa en cerdos machos castrados de 50 Kg alimentados con dietas suplementadas con 0,1% de betaína. La adición de CLA disminuyó la digestibilidad aparente total de la grasa total y los ácidos palmítico, oleico, linoleico y linolénico, aumentando la del isómero 9c,11t del CLA y sin afectar la del esteárico. Si además de CLA se añade betaína, los efectos son similares a la adición individual de CLA, excepto que no son significativas las diferencias respecto al control para los ácidos palmítico y linolénico ($P > 0,10$). La baja digestibilidad aparente fecal del ácido esteárico puede deberse a síntesis *de novo* del mismo (Mason y Just, 1976) o bien a biohidrogenación de ácidos grasos insaturados a saturados (Carlson y Bayley, 1968) por la microflora. Se puede especular que los ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) que llegan al intestino grueso son al menos en parte saturados por la microflora y convertidos en ácido esteárico (C18:0).

La adición de betaína y CLA produjo una disminución de la digestibilidad aparente fecal de la mayoría de los ácidos grasos individuales de las dietas utilizadas, en cerdos Ibéricos en crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carlson, W.E. y Bayley, H.S. 1968. Can. J. Anim. Sci. 48:315.
Fernández-Figares, I., Conde-Aguilera, J.A., Nieto, R., Lachica, M., y Aguilera, J.F. 2008a. J. Anim. Sci. 86: 102-111.
Fernández-Figares, I., Rodríguez-López, J.M., González-Valero, L., Nieto, R., Lachica, M. y Aguilera, J.F. 2008b. J. Anim. Sci. 86, E-Suppl. 2: 37.
Fernández-Figares, I., González-Valero, L., Rodríguez-López, J.M., Nieto, R., Lachica, M. y Aguilera, J.F. 2008c. J. Anim. Sci. 86, E-Suppl. 2: 238.
Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. 1957. J. Biol. Chem. 193:265-275.
Mason, V.C. y Just, A. 1976. Tierern. Futtermittelkde. 36:301.
Øverland, M., Rorvik, K.A. y Skrede, A. 1999. J. Anim. Sci. 77:2143–2153.

Tabla 1. Coeficientes de digestibilidad aparente fecal de la grasa bruta y ácidos grasos individuales de cerdas Ibéricas de 30 Kg alimentadas con dietas suplementadas o no con 0,5% betaina, 1,0% CLA o ambos (n=5/grupo).

	Control	Betaina	CLA	CLA+Betaina	e.e.
Palmitico (C16:0)	0,75 ^a	0,64 ^b	0,61 ^b	0,66 ^a	0,033
Estearico (C18:0)	0,48 ^a	0,29 ^b	0,34 ^a	0,45 ^a	0,057
Oleico (C18:1)	0,93 ^a	0,83 ^a	0,60 ^b	0,68 ^b	0,059
Linoleico 9c-12c (C18:2)	0,93 ^a	0,87 ^b	0,80 ^b	0,82 ^b	0,021
CLA 9c-11t (C18:2)	0,48 ^a	0,40 ^a	0,89 ^b	0,86 ^b	0,043
CLA 10t-12c (C18:2)	-	-	0,88 ^a	0,85 ^a	0,031
Linolenico (C18:3)	0,91 ^a	0,84 ^a	0,79 ^b	0,84 ^a	0,032
Grasa Total	0,85 ^a	0,81 ^a	0,75 ^b	0,79 ^b	0,020

^{a,b} Valores con distinto superíndice dentro de una misma fila, difieren significativamente del Control (P<0,05).

Agradecimientos

Este proyecto ha sido cofinanciado por los proyectos AGL2002-01562 y 2006 4 OI 025.

EFFECT OF BETAINE, CLA OR BOTH ON FAT AND FATTY ACIDS DIGESTIBILITY OF GROWING IBERIAN PIGS

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the effects that betaine (BET) and CLA on apparent fecal digestibility of fat and individual fatty acids of Iberian growing pigs (20-50 kg BW). Gilts (n=20) were fed control, 1% CLA, 0.5% BET or 1% CLA+0.5% BET isoenergetic diets at 95% of *ad libitum* intake. Feed intake was adjusted weekly according to BW. At 30 kg BW, a balance experiment was conducted where a 4 days total excreta collection was performed. Aliquots of faeces and diets were frozen at -20°C until further analysis. Fatty acids were extracted, methylated and analyzed by gas chromatography. Betaine addition decreased apparent total tract digestibility of palmitic, stearic and linoleic acids with no effect on total fat, CLA or oleic acid. Dietary CLA decreased apparent fecal digestibility of total fat, oleic, linoleic and linolenic acids and increased 9c-11t CLA. Similar effects were found when CLA+BET were added except that only a trend towards decreased palmitic and linolenic acid apparent fecal digestibilities were found. Betaine and CLA decreased apparent fecal digestibility of most individual fatty acids in growing Iberian pigs.

Keywords: Betaine, CLA, Iberian pigs, fatty acids digestibility

EFFECTO DEL ORIGEN DE LA HARINA DE SOJA Y DE LA ESTIRPE DE POLLOS SOBRE LOS PARAMETROS PRODUCTIVOS DE 1 A 37 DIAS DE EDAD

Frikha, M.¹, Serrano, M.P.¹, Jiménez-Moreno, E.¹, Habboul, M.² y Mateos, G.G.¹

¹Departamento de Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid.
gonzalo.gmateos@upm.es. ² Société de Nutrition Animal, S.A. 2055 Borj Cedria, Tunisie.

INTRODUCCIÓN

La harina de soja (HS) es una excelente fuente de proteína con un perfil equilibrado en amino ácidos (AA), excepto para la metionina. En pollos, la digestibilidad de la energía y de los AA es superior en HS con altos contenidos en proteína bruta (PB) y bajos en inhibidores de tripsina (IT) y fibra bruta (FB) (De Coca-Sinova et al., 2008). Estos autores observaron una correlación negativa entre el contenido en IT, oligosacáridos y FB y la disponibilidad de la energía y los AA. De forma similar, Valencia et al. (2008) indican que la utilización digestiva de la proteína de la HS mejoraba con el descascarillado. Grieshop y Fahey (2001) compararon distintos tipos de HS y determinaron que las HS de Estados Unidos (USA) presentaban mejores características químicas y nutricionales que las de Brasil (BRA) o Argentina (ARG). Resultados similares han sido publicados por Sueiro et al. (2008). Las necesidades nutricionales de los pollos han sido estudiadas por numerosas instituciones (NRC, 1994; FEDNA, 2008). Se sabe que las diferentes estirpes de pollos responden de forma diferente a aumentos en la concentración energética y en Lys digestible (Lys dig) del pienso. El presente ensayo tuvo como objetivo estudiar la influencia de piensos basados en 2 fuentes de HS (ARG vs. USA) sobre la productividad de 2 líneas de pollos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 5.200 pollos sin sexar de 1 d de edad, de dos estirpes Hubbard diferentes. Se formularon 3 tipos de piensos basados en maíz y HS en base de las Tablas FEDNA (2003, 2008): est rter (migaja fina, 1 a 14 d), crecimiento (migaja gruesa, 15 a 21 d) y acabado (gránulo de 3,5 mm, 22 a 37 d de edad). En cada una de las fases se formularon 2 piensos cuya principal diferencia era el tipo de HS utilizada (Tabla 1). En base a trabajos anteriores (De Coca-Sinova et al., 2008), se estimó que las HS de ARG y de USA contenían 2.310 y 2.390 kcal/kg de EMAn, 28,50 y 27,33% de PB y 2,61 y 2,68% de Lys digestible, respectivamente. Las 2 dietas experimentales de cada período mantuvieron constante el nivel de EMAn y de Lys digestible (Tabla 2). Por ello, los piensos basados en HS ARG contenían aproximadamente un 1,2% más de HS y 0,5% más de aceite de soja y un 1,7% menos de maíz que los basados en HS USA. El diseño experimental fue completamente al azar con 2 piensos en base a HS ARG   USA y 2 estirpes de pollos (F15 y JV). La estirpe F15 se utilizó por su mayor velocidad de crecimiento mientras que la estirpe JV se caracteriza por su rusticidad y mayor resistencia al calor. Cada tratamiento se replicó 10 veces y la unidad experimental fue el departamento (4 m x 1,75 m) con 130 pollos. Se controló el peso y el consumo de pienso por réplica a 0, 14, 21, y 37 d de edad. A partir de estos datos se calculó la ganancia de peso (GMD), el consumo de pienso (CMD) y la conversión alimenticia (IC) por período y global. La mortalidad media fue baja (2,63%) y se utilizó para corregir los datos productivos.

Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute, 1990) para diseños completamente al azar con 4 tratamientos ordenados de forma factorial (2 órdenes de la HS y 2 estirpes de pollos) y se analizaron los efectos principales y las interacciones. Los resultados se presentan en tablas como medias normales. Se consideró una diferencia significativa entre tratamientos para valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Análisis determinado de las harinas de sojas testadas (% ssf)¹

	ARG	USA
Materia seca	88,70	88,30
Cenizas	6,25	6,10
Extracto etéreo	1,60	1,10
EMAn	2.310	2.390
Proteína bruta	47,33	48,50
Lys total ²	2,93	2,98
Sacarosa	7,00	6,50
Fibra bruta	3,50	3,70
AIT ³ , mg/g	3,10	2,40
PDI, % ⁴	12,40	14,90
Solubilidad en KOH	81,20	86,80

¹ n=2. ² Valores estimados de Lys digestible de 2,68 y 2,61 %, respectivamente. ³ Actividad de inhibidores de la tripsina. ⁴ Índice de dispersibilidad de la proteína.

Tabla 2. Composición y valores nutritivos de los piensos experimentales (% ssf)

	De 1 a 14 d		De 15 a 21 d		De 22 a 37 d	
	ARG	USA	ARG	USA	ARG	USA
Ingredientes						
Maíz	59,60	60,80	64,40	65,90	67,30	69,00
Harina de soja	36,40	35,20	31,40	30,40	29,00	27,80
Aceite de soja	--	--	0,50	--	0,50	--
DL-metionina	0,09	0,12	0,06	0,09	0,04	0,06
Otros ¹	3,91	3,88	3,64	3,61	3,16	3,14
Análisis calculados						
EMAn, Kcal/kg	2.780	2.815	2.850	2.865	2.890	2.900
Lys digestible	1,04	1,04	0,92	0,92	0,86	0,86
Met+cys total	0,82	0,83	0,74	0,76	0,70	0,70
Análisis determinados						
Proteína bruta	23,00	22,32	21,53	21,19	20,28	20,28
Cenizas	5,43	5,27	5,30	5,21	4,83	4,88
Calcio	1,18	1,04	1,05	1,05	0,99	1,01
Fósforo total	0,64	0,65	0,65	0,61	0,52	0,62

¹ Incluye: fosfato bicálcico, carbonato cálcico, sal, betaína y corrector vitamínico y mineral.

El tipo de pienso no influyó sobre los parámetros productivos de los pollos a ninguna edad a pesar de la menor incorporación de HS y aceite de soja en los piensos basados en HS USA (Tabla 3). Al final de la prueba, los pollos de la estirpe F15 consumieron más pienso ($P < 0,01$) y crecieron más rápido ($P < 0,001$) que los de la estirpe JV. Los resultados indican que la HS USA contiene mas AA digestibles y EMAn que la HS ARG lo que puede ser debido al mayor contenido en sacarosa y en PB y a la mayor digestibilidad de la fracción proteica. Por lo tanto, es recomendable analizar las HS recibidas en fábricas de pienso previo a su utilización en alimentación de pollos.

Tabla 3. Efecto del origen de la harina de soja y la estirpe de pollos sobre los parámetros productivos de 1 a 37 d de edad

	Origen HS		Estirpe Hubbard		e.e. (n=10)	P ¹	
	ARG ²	USA ³	F15	JV		Origen	Estirpe
De 1 a 14 d de edad							
GMD ⁴	24,9	24,7	24,9	24,7	0,32	NS	NS
CMD ⁵	33,0	33,0	33,2	32,8	0,23	NS	NS
IC ⁶	1,33	1,34	1,34	1,33	0,010	NS	NS
De 15 a 21 d de edad							
GMD	54,1	53,9	55,1	52,9	0,86	NS	NS
CMD	88,1	88,4	89,8	86,7	0,66	NS	**
IC	1,63	1,64	1,63	1,64	0,018	NS	NS
De 22 a 37 d de edad							
GMD	76,7	77,9	79,6	75,0	0,65	NS	***
CMD	147,2	149,5	152,0	144,7	1,63	NS	**
IC	1,92	1,92	1,91	1,93	0,017	NS	NS
De 1 a 37 d de edad							
GMD	52,8	53,2	54,2	51,8	0,32	NS	***
CMD	92,8	93,8	95,3	91,4	0,76	NS	**
IC	1,76	1,76	1,76	1,76	0,011	NS	NS

¹ Las interacciones no fueron significativas ($P > 0,05$). ² Argentina (Puerto de Rosario). ³ Owensboro Grains, Owensboro, KY, EEUU. ⁴ Ganancia media diaria, g. ⁵ Consumo medio diario, g. ⁶ Índice de conversión. NS: no significativo; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Coca-Sinova, A., Valencia, D. G., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. & Mateos, G. G. 2008. *Poult. Sci.* 87: 2613-2623.
- FEDNA. 2003. De Blas, C., Mateos, G. G. & Rebollar, P. G. (Eds.). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. 2ª ed. FEDNA, Madrid, España.
- FEDNA. 2008. Lázaro, R. & Mateos, G. G. (Eds.). Necesidades nutricionales para avicultura. FEDNA, Madrid, España.
- Grieshop, C. M. & Fahey Jr, G. C. 2001. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2669-2673.
- NRC. 1994. 9ª ed rev. Natl. Acad. Press. Washington, DC.
- SAS Institute. 1990. *SAS user's guide: statistics*. Versión 6, 4ª edición. Cary, NC: SAS Institute, Inc, USA.
- Sueiro, S., Hermida, M., Valencia D. G., Serrano, M. P. & Mateos, G. G. 2008. *Poult. Sci.* 87: 29 (Abstr.).
- Valencia D. G., Serrano, M. P., Lázaro, R., Jiménez-Moreno, E. & Mateos, G. G. 2008. *Anim. Feed Sci. Technol.* doi: 10.1016/j.anifeedsci.2008.08.010.

EFFECT OF ORIGIN SOYBEAN MEAL ON PRODUCTIVE PERFORMANCE OF TWO STRAINS BROILER FROM 1 TO 37 DAYS OF AGE

ABSTRACT: A total of 5,200 straight-run, one-day-old Hubbard chicks (half of the F15 strain and half of the JV strains) were used to study the influence of the origin of soybean meal (SBM) on performance from 1 to 37 d of age. There were 2 diets based on Argentinean (ARG) or North American (USA) SBM. Broilers were fed a starter (1 to 14 d), grower (15 to 21 d), and a finisher diet (22 to 37 d). For each of the 3 periods the 2 experimental diets had similar AMEn and digestible Lys content and the main difference between diets was the origin of the SBM used. Diet did not affect any performance trait at any age in spite of diet based on USA SBM having less SBM (1.2%) and less added soy oil (0.5%) than the diet based on ARG SBM. From 1 to 37 d of age broilers from the F15 strain ate more feed ($P < 0.01$) and grew faster ($P < 0.001$) than JV broilers. We concluded that USA SBM had more digestible lysine and AMEn than ARG SBM and that performance was better for broilers of the F15 than for broilers of the JV strain.

Keywords: soybean meal origin, broiler strain, performance.

EFFECTO DEL ORIGEN DE LA HARINA DE SOJA SOBRE LOS PARAMETROS PRODUCTIVOS EN POLLOS DE ENGORDE

Solà-Oriol¹, D., Pérez, J.F.¹ y Mateos, G.G.²

¹Grup de Nutrició, Maneig i Benestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Veterinària, 08193 Bellaterra. josefrancisco.perez@uab.cat. ²Departamento de Producción Animal, UP Madrid, Ciudad

Universitaria, 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

La harina de soja (HS) es la fuente de proteína de origen vegetal más utilizada en la alimentación de monogástricos. En 2007 se produjeron 32 Millones de Tm de HS en Estados Unidos (USA) de los cuales el 50% fueron consumidos por el sector avícola y el 27% por el sector porcino. En este período, Argentina (ARG), Brasil (BRA) y USA fueron responsables del 51%, 22% y 14% del comercio mundial de soja (Soystats, 2008) siendo la UE-25 el principal importador. Generalmente se asume que la homogeneidad y calidad del producto exportado es constante. Sin embargo, diversos autores sugieren que, tanto las condiciones agronómicas como el procesado tecnológico pueden alterar el valor nutritivo y la digestibilidad del ingrediente, sobretudo en lo que se refiere al valor de digestibilidad de los aminoácidos (AA) (de Coca-Sinova *et al.*, 2008; Valencia *et al.*, 2008). Variaciones en la composición y la calidad de este ingrediente tiene implicaciones productivas y económicas, si no se tienen en cuenta en las matrices de formulación. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto del origen de las HS (ARG, BRA, USA-1 (Owensboro Grain, Kentucky) y USA-2 (Carolina Soya, Carolina del Sur) sobre los parámetros productivos en pollos de engorde de 1 a 35 días de vida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 240 pollos broiler (*Ross 308*) de un día de vida y con un peso medio de 46 g. A su llegada al centro experimental, las aves fueron distribuidos en 4 corrales y alimentados con una de las cuatro dietas experimentales hasta el día 7 post-eclosión. A esta edad cada grupo de pollos fue distribuido en tres bloques de acuerdo al peso vivo (pequeños, medianos y pesados) y fueron realojados en 12 jaulas por tratamiento (5 animales por jaula; n=12). Los 4 tratamientos experimentales se prepararon en base a cebada, trigo y una de las 4 HS objeto de estudio. Estos HS diferían en el origen, contenido en proteína bruta (PB) y contenido en azúcares. Previo a la formulación de las dietas se determinó el contenido de PB tanto de los cereales como de las HS experimentales (Tabla 1).

Tabla 1 Composición analizada (n = 2) de nutrientes para las diferentes harinas de soja estudiadas (%)

Nutriente	Argentina	Brasil	USA-1	USA-2
Materia seca	89,9	88,7	88,4	89,5
Proteína bruta	44,3	48,9	49,3	49,1
Extracto etéreo	2,0	1,6	1,5	1,7
FND	11,4	7,1	9,7	10,3
PDI	15,6	21,0	14,9	15,0
Solubilidad KOH	85,2	88,0	86,8	84,4
Actividad inhibidores de la tripsina (mg/g)	3,1	4,0	3,2	2,7
Digestibilidad <i>in vitro</i>				
Materia seca (%)	84,42	87,81	86,69	85,60
Proteína bruta (%)	98,40	98,40	98,30	97,95

Se formularon dos tipos de piensos según edad: inicio (0 a 21 días) que contenía 3.000 kcal/EMAn kg, 21% PB y 1.25% de lisina y crecimiento (21 a 35 días) con 3140 kcal/EM kg, 19,7% PB y 1,14% de Lisina (Fedna, 2008). Todas las dietas fueron suplementadas con 500 g de β -glucanasa+ β -xilanas/Tm. De 0 a 7 días, las dietas se ofrecieron *ad libitum* en forma de migaja y de los 7 a los 35 d en gránulo de 3 mm. Se determinó semanalmente el consumo de pienso y el peso vivo por réplica y de aquí se calculó el consumo de alimento (CMD), la ganancia media diaria (GMD) y el índice de conversión (IC).

Los diferentes parámetros productivos estudiados fueron analizados por ANOVA siguiendo un diseño en bloques completamente aleatorizado con 4 dietas experimentales y 3 bloques de peso inicial mediante la subrutina GLM del paquete estadístico SAS®. El modelo matemático utilizado fue: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ij}$, donde Y es la variable dependiente, α_i es el efecto del origen de la HS (ARG, BRA, USA-1 y USA-2), β_j es el efecto del peso inicial (pequeños, medianos y pesados) y $\alpha\beta_{ij}$ es la interacción entre el origen de la HS y el bloque de peso inicial. Adicionalmente se realizaron contrastes de significación para determinar diferencias específicas entre los diferentes orígenes de las harinas de soja.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los 7 primeros días de vida la GMD fue numéricamente (n=1) superior para los animales que consumieron HS USA-2 respecto a los animales que consumieron la HS ARG (182,6 vs 173,5 g de PV a día 7). Sin embargo, durante el período de 7 a 21 días los animales alimentados con la HS ARG presentaron un mayor CMD (P<0,05) que el resto. Estas diferencias desaparecieron durante el período de crecimiento (21-35 d; Tabla 2)

Tabla 2 Parámetros productivos de los pollos de 1 a 35 días de vida

Parámetros productivos ¹	Tratamiento ²				e.e.	(Pr>F)	
	Argentina	Brasil	USA-1	USA-2		Efecto Bloque	Efecto Soja
n	1	1	1	1	-	-	-
(0-7 días) ³							
CMD (g/d)	24,7	22,4	22,4	23,5	-	-	-
GMD (g/d)	18,0	18,6	18,8	19,5	-	-	-
IC	1.372	1.204	1.196	1.208	-	-	-
PV a día 7	173,5	176,8	178,3	182,6	-	-	-
n	12	12	12	12	-	-	-
(7-21 días)							
CMD (g/d)	84,2 a	80,3 b	80,3 b	79,4 b	0,775	***	***
GMD (g/d)	64,1	62,6	63,2	63,4	0,597	***	NS
IC	1.313 a	1.285 ab	1.271 ab	1.254 b	0,0117	†	**
(21-35 días)							
CMD (g/d)	144,9	142,7	145,4	146,1	3,018	NS	NS
GMD (g/d)	84,6	85,2	86,4	89,7	1,988	NS	NS
IC	1.716	1.687	1.690	1.635	0,0472	NS	NS
(7-35 días)							
CMD (g/d)	115,9	113,3	114,4	113,6	1,175	†	NS
GMD (g/d)	74,4	74,1	74,8	76,3	0,955	*	NS
IC	1.557 a	1.529 ab	1.529 ab	1.490 b	0,0128	NS	**
PV a día 35 (g)	2271,5	2290,6	2278,4	2322,4	27,65	*	NS

¹CMD: consumo medio diario; GMD: ganancia media diaria; IC: índice de conversión.

²USA-1: ¹Owensboro Grain (Kentucky); USA-2: Carolina Soya (Carolina del Norte).

³Período pre-experimental.

NS (no significativo): P>0,05; †P<0,10; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

De 21 y 35 de edad los pollos que recibieron la HS USA-2 tendieron a presentar mayor ganancia de peso (89,7 vs 84,6 g/d, respectivamente; $P < 0,08$) que los que recibieron HS ARG. Como consecuencia, se detectaron diferencias significativas para el IC ($P < 0,05$) entre estas dos HS tanto durante el período de iniciación (1,313 vs 1.254; $P < 0,05$) como para el global de la prueba (1,557 vs 1,490; $P < 0,05$). La menor eficiencia observada para la de HS ARG podría estar relacionada con su mayor contenido en FND, así como a su menor contenido en PB con respecto al resto de las HS estudiadas. Asimismo, se ha citado que un nivel alto de factores antitripsicos ($> 3-4$ mg/g) puede afectar los rendimientos productivos en pollos de engorde (Clarke y Wiseman, 2007). El nivel de inhibidores de proteasas observado para la HS USA-2 (2,7 mg/g) fue inferior al determinado en las HS ARG (3,1 mg/g), USA-1 (3,2 mg/g) y BRA (4 mg/g), lo que podría en parte explicar las diferencias observadas.

Se concluye que, aun formulando para un contenido similar en PB, los rendimientos productivos pueden verse afectados por el origen y composición de la harina de soja utilizada en la fabricación de la dieta para pollos de engorde. De hecho, en este ensayo, la utilización de harina de soja americana permitió mejores conversiones que la utilización de soja argentina. Por tanto, las fábricas de pienso deberían analizar las harinas de soja recibidas previamente a su utilización en fábrica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Clarke, E., y J. Wiseman. 2007. *British Poultry Science* 48: 703-712.
- de Coca-Sinova, A., D. G. Valencia, E. Jimenez-Moreno, R. Lazaro y G. G. Mateos. 2008. *Poultry Science* 87: 2613-2623.
- Fedna. 2008. Lázaro, R. y Mateos, G.G. (eds). En: FEDNA (ed.) *Necesidades nutricionales para avicultura*, Madrid.
- Soystats. 2008. *The American Soybean Association*.
- Valencia, D.G., M.P. Serrano, R. Lázaro, M.A. Latorre y G.G. Mateos. 2008. *Animal Feed Science and Technology* 147: 340-356.

INFLUENCE OF THE ORIGIN OF SOYBEAN MEAL ON PERFORMANCE OF BROILERS FROM SEVEN TO THIRTY FIVE DAYS OF AGE

ABSTRACT: A total of 240 straight-run broilers (ROSS 308), one-day old were used to study the influence of source of soybean meal (SBM) on productive performance of broilers. There were 4 experimental diets based on cereals and SBM under study with the same crude protein (CP) content. The SBM tested were obtained from Argentina (ARG), Brazil (BRA), or USA (either from Owensboro Grain, KY; USA-1 or Carolina Soya, NC; USA-2). Each treatment was replicated 12 times and the experimental unit was a cage with 5 chicks each. There were 2 feeding periods; 1 to 21 d (3000 kcal AMEn/kg, 21% CP, and 1.25% total Lys) and 21 to 35 d of age (3140 kcal AMEn/kg, 19.7% CP, and 1.14% total lys). From 7 to 35 d of age, the only difference detected was for feed conversion ratio that was lowest for USA-2 and highest for ARG meal with US-1 and BRA meals being intermediate (1.490, 1.557, 1.529, and 1.529, respectively; $P < 0.01$). Also, from 7 to 21 d of age, broilers fed ARG meal showed higher feed intake (84.2 vs 79.4, 80.3, and 80.3; $P < 0.001$) but with less efficiency (1.313 vs 1.254, 1.271, and 1.285; $P < 0.01$) than broilers fed USA-1, USA-2 or BRA meal, respectively. The differences observed in broiler performance among the different soybean meals might be due to the differences in NDF, trypsin inhibitor (TI), CP, and saccharose content. In fact, ARG SBM had more NDF and less CP and lower TI activity than USA-2 meal. It is concluded that feed mills should analyze incoming SBM batches for major nutrients prior to feed formulation.

Keywords: *Soybean meal origin, Broiler performance*

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIÉTETICA CON EUGENOL SOBRE LOS RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS, MICROBIOTA Y MORFOLOGÍA INTESTINAL EN POLLOS DE CARNE

Solà-Oriol, D.¹, Nofrarías, M.², Anguita, M.¹, Barroeta, A.C.¹ y Gasa, J.¹

¹ Grup de Nutrició, Maneig i Benestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. UAB.Facultat de Veterinària, 08193 Bellaterra, Barcelona. David.sola@uab.cat.

²Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 08193, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Hace más de dos años que la UE prohibió el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en los piensos de avicultura. Por ello, se están estudiando diferentes alternativas a dichas sustancias que permitan mejorar la sanidad animal, la productividad y la seguridad alimentaria. Actualmente, se invierten grandes esfuerzos en investigación desde el punto de vista alimentario, para el desarrollo de alternativas a las sustancias antimicrobianas como son los probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos y extractos de plantas. Estudios recientes con aceites esenciales han presentado mejoras tanto a nivel productivo como inmunitario.

Essenpro.a[®] es un producto que ha sido desarrollado en base a una mezcla de aceites esenciales que presenta una concentración superior al 5% de extracto de *Syzygium aromaticum* (clavo). El componente principal del aceite de extracción del clavo es el eugenol (72-90%), además incluye otros aceites esenciales como el acetyl-eugenol, la vainillina y la beta-cariofilina, y también presenta algunos flavonoides y triterpenoides. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la inclusión de Essenpro.a[®] en las dietas para pollos de engorde sobre los rendimientos productivos, la microbiota intestinal y la morfometría intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente estudio se utilizaron un total de 240 pollos 'broiler' (Ross 308) de un día de vida y con un peso medio de $39,6 \pm 0,71$ g. A día 0 los animales fueron distribuidos en 40 corrales de 20 pollos (8 replicas/tratamiento) repartidas en 4 salas (10 corrales/sala). Se prepararon 5 piensos experimentales de acuerdo a cinco niveles crecientes de Essenpro.a[®] (T1=0ppm, T2=100ppm, T3=200ppm, T4=1000ppm y T5=2500ppm). Para cada tratamiento se formularon 3 especificaciones diferentes de la misma dieta: una dieta de inicio (0 a 20 días) en base a maíz soja formuladas para contener 3075 kcal/kg EM, 20,5% PB y 1,27% de Lisina, una dieta de crecimiento (20 a 35 días) y una de acabado (35 a 42 días) ambas en base a cebada y soja formuladas para contener 3199 kcal/kg EM, 20,0% PB y 1,15% de Lisina y 3175 kcal/kg EM, 18,5% PB y 0,97% de Lisina, respectivamente. A su vez, se plantearon dos pautas de administración del producto experimental, bien administrándolo durante todo el ciclo productivo (0 a 42 días) o bien con la retirada del mismo en la fase de acabado (35 a 42 días). Los piensos experimentales fueron administrados *ad libitum* en forma de granulado. El consumo de pienso y el peso de los animales fueron registrados semanalmente (a los 7, 14, 21, 28 y 35 días) para poder calcular el consumo medio diario, la ganancia media diaria (GMD) y el índice de conversión (IC). Durante la realización del experimento, se estudio la modificación de la microbiota intestinal y la morfología intestinal como consecuencia de la incorporación en el pienso de Essenpro.a[®]. Para ello, se procedió al sacrificio y recogida de tejido ileal y muestras de contenido cecal de 12 animales del tratamiento control (T-1) así como del tratamiento Essenpro.a[®] 100 ppm (T-2) a los 21 y 42 días de edad.

Las muestras de contenido cecal fueron procesadas mediante PCR cuantitativa, para la determinación del número total de *Enterobacteriaceae* y de *Lactobacillus spp.*, utilizando la metodología descrita por Castillo et al. (2007). Por otra parte, se determinó la altura de las vellosidades, la profundidad de las criptas, el número de linfocitos en el epitelio intestinal y en la lámina propia en los cortes histológicos de las muestras de tejido ileal recogidas a 21 y 42 días.

Los diferentes parámetros productivos estudiados fueron analizados por día con ANOVA con 5 tratamientos experimentales y 3 salas mediante la subrutina GLM del paquete estadístico SAS®. El modelo matemático utilizado fue: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ij}$, donde Y es la variable dependiente, α_i es el efecto del tratamiento experimental (T1 a T5), β_j es el efecto sala (1 a 4) y $\alpha\beta_{ij}$ es la interacción entre el tratamiento experimental y la sala. En el caso del estudio de la microbiota cecal y la morfometría intestinal, el modelo utilizado fue $Y_i = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i$, donde Y es la variable dependiente, α_i es el efecto del tratamiento experimental (T1 y T2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron mejoras del IC asociados a la incorporación de 100 y 200 mg/kg de Essenpro.a® en el período de 0 a 35 días. Durante este período, los animales que consumieron la dieta con 200 mg/kg de Essenpro.a® presentaron mejor IC que los animales de la dieta control (1,63 vs 1,76; $P < 0,05$). También se pudo observar que los animales que consumieron la dieta con 100 mg/kg de Essenpro.a® presentaron un mejor IC hasta los 42 días que los animales de la dieta control (1,92 vs 1,85; $P < 0,05$). Dosis de inclusión superiores a 200 mg/kg no presentaron mejora ni en GMD ni IC respecto al grupo control, presentando valores inferiores a los observados para la dosis de inclusión de 200 mg/kg. Puede considerarse que el mayor peso vivo observado para los animales que consumieron la dieta con 100 mg/kg de Essenpro.a® va asociado a la mejor eficiencia previamente citada. Aquellos grupos en los que se retiró el producto durante la última semana (200, 1000 y 2500 mg/kg) tendieron a presentar ($P = 0,108$) mejor IC respecto a la dieta control. Se sugiere que dicha mejora podría estar asociada a la mejora observada durante el periodo previo a la retirada.

Por otra parte, a los 21 días, se pudo observar que los animales que consumieron la dieta con un nivel de inclusión de 100 mg/kg de Essenpro.a® presentaron mayor recuento de *Lactobacillus spp* (log UFC) a nivel cecal ($P < 0,05$), que hizo disminuir la ratio *Enterobacterias:Lactobacillus spp* ($P < 0,05$) respecto los animales del grupo control. Sin embargo a los 42 días de edad, los recuentos de *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillus spp* no se vieron modificados por el tratamiento experimental. De acuerdo con los resultados presentados por Wise et al. (2007), tanto el nivel de *Lactobacillus spp* como la relación entre *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillus spp* a nivel cecal, serían más similares a una dieta que contiene antibióticos, lo que podría sugerir que la inclusión de 100 mg/kg de producto favorecería el desarrollo de *Lactobacillus spp*.

En cuanto a la morfometría intestinal, no se observaron alteraciones asociadas al tratamiento experimental (100 mg/kg de Essenpro.a®) ni en la altura de las vellosidades ni en la profundidad de las criptas así como tampoco entre la ratio entre ambos parámetros ni a los 21 ni 42 días de vida. Sin embargo, en el tejido linfoide asociado al ileon se pudo observar mayor número de linfocitos intraepiteliales (día 21 $P < 0,01$; día 42 $P = 0,09$), así como mayor densidad de células en la lámina propia (día 21 $P < 0,01$) en los animales que consumieron la dieta con 100 mg/kg de Essenpro.a® respecto a los animales del grupo control (Tabla 1). Tanto el mayor número de linfocitos como de células en la lámina propia se puede interpretar como una mayor respuesta inmunitaria del animal, tal y como se ha demostrado a determinadas dosis de eugenol en modelos murinos (Vishteh et al., 1986).

Se puede concluir que la inclusión de 100 mg/kg de Essenpro.a® durante el ciclo de crecimiento permite mejorar el IC en pollos de engorde y aumentar el número de *Lactobacillus spp* a nivel cecal y mejorar la relación *Enterobacteriaceae:Lactobacillus* respecto los animales del grupo control. Asimismo la suplementación de 100 mg/kg de Essenpro.a® en los piensos para pollos de carne pueden tener un efecto positivo sobre la activación de la respuesta inmune, sin alterar la integridad de la mucosa tanto a nivel ileal como cecal.

Tabla 1. Resultados del estudio de la morfometría ileal a los 21 y 42 días.

	Tratamiento		Std	(Pr>F)
	Control	100 mg/kg Essempro.a®		
21 días				
Altura vellosidades (µm)	786,5	761,5	63,76	NS
Profundidad criptas (µm)	160,2	163,6	18,14	NS
Relación Vellosidades:Criptas	5,07	5,07	0,761	NS
Linfocitos intraepiteliales en 100µm	1,55	2,22	0,321	**
Densidad células lámina propia	5,98	6,83	0,451	**
Densidad linfocitos lámina propia	1,53	1,46	0,347	NS
42 días				
Altura vellosidades (µm)	1026,4	955,6	151,14	NS
Profundidad criptas (µm)	240,0	252,7	50,45	NS
Relación Vellosidades:Criptas	4,50	3,98	1,123	NS
Linfocitos intraepiteliales en 100µm	2,72	3,53	0,739	t
Densidad células lámina propia	9,47	9,79	0,702	NS
Densidad linfocitos lámina propia	2,96	2,94	0,522	NS

Los valores son medias (n =6). NS: P>0,1; t:P<0,10, *:P<0,05; **:P<0,01

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Nofrarias, M., Manzanilla, E.G. y Gasa, J. 2007. *Veterinary Microbiology* 124: 239-247.
- Vishteh A., Thomas I. y Imamura T. 1986. *Immunopharmacology* 12:187-192.
- Wise, M.G. y Siragusa, G.R. 2007. *Journal of Applied Microbiology* 102:1138-1149.

EFFECT OF DITEARY EUGENOL SUPPLEMENTATION ON BROILER PERFORMANCE AND INTESTINAL MICROBIOLOGY AND MORPHOLOGY

ABSTRACT: The aim of the present work was to evaluate the effect of dietary Essenpro.a® supplementation (a product based on a blend of essential oils with > 5% of *Syzygium aromaticum* extract) on growth performance, intestinal microbiology and intestinal morphology. Five experimental treatments consisting of increasing levels of Essenpro.a® inclusion: 0 (control T-1), 100 (T-2), 200 (T-3), 1000 (T-4) y 2500 (T-5) mg/kg were randomly distributed amongst 40 replicates of 20 broilers. A reduction in the feed gain ratio was observed by the effect of Essenpro.a® at the inclusion level of 100 mg/kg during the whole productive cycle (1.92 control vs. 1.82 100 mg/kg) and at 200 mg/kg from 0 to 35 days (1.76 control vs 1.63 200 mg/kg). The *Enterobacteriaceae* counts at caecal level were not affected by Essenpro.a® supplementation in 21d-old animals, nevertheless the number of *Lactobacilli* (9,62 vs 9,18; P<0.05) was highly increased respect to the control diet. Moreover, Essenpro.a® inclusion at 100 mg/kg was able to modulate intestinal immune response.

Keywords: *Eugenol; Broilers; Immune response.*

EFFECTO DEL PERFIL EN ÁCIDOS GRASOS DE LA RACIÓN SOBRE LA RETENCIÓN DE ENERGÍA Y GRASA EN POLLOS DE CARNE

Salari, S., Cánovas, E., Barroeta, A.C. y Gasa, J.
Grup de Nutrició, Maneig i Benestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments.
Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Veterinària, 08193 Bellaterra, Barcelona.
ana.barroeta@uab.es

INTRODUCCIÓN

Diversos autores han demostrado que la utilización de aceites ricos en ácidos grasos (AG) poliinsaturados (AGPI), en comparación con grasas ricas en AG saturados (AGS), da lugar a una reducción de la cantidad de grasa depositada en el animal (Sanz et al., 2000; Villaverde et al., 2005). Los resultados de algunos estudios apuntan que el consumo de AGPI podría aumentar la producción de calor del organismo y por lo, por lo tanto, reducir la energía retenida en el animal. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la fuente de grasa de la ración sobre la retención de energía, proteína y grasa en pollos de carne.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 74 pollos hembra de la estirpe Ross 308 (Terra-Avant, S.A. Anglés, Girona). Se realizó un balance entre los 28 y los 49 días de vida, con controles de ingestión de pienso y peso de los animales, recogida total de excreta y sacrificios inicial y final. A los 28 días de edad, 10 animales fueron sacrificados (animales control) y el resto se alojaron en jaulas individuales y se distribuyeron en los 8 tratamientos experimentales (8 aves por tratamiento). Los piensos suministrados durante el periodo experimental fueron formulados según las recomendaciones del NRC (1994) a partir de una dieta en base a trigo y soja, a la que se añadió un 10 % de una de las 2 fuentes de grasa utilizadas: sebo (S) y aceite de linaza (L). Los factores de variación fueron el tipo de grasa añadida al pienso y el nivel de alimentación: *ad libitum* (A) y restringido al 80 % (80), 60 % (60) y 40 % (40) del consumo *ad libitum*. En las muestras de pienso, heces y animal entero se realizó el análisis de Weende, la energía bruta y la cuantificación de los AG (Villaverde et al., 2005). Para el análisis estadístico de los distintos parámetros estudiados se utilizó el procedimiento GLM del SAS® para Windows versión 9.1 (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Las diferencias de las medias entre tratamientos, se compararon usando el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados productivos registrados a lo largo del periodo experimental no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de grasa añadida (Tabla 1.). Estos resultados concuerdan con los de otros autores que al adicionar al pienso altos niveles (8-10%) de grasas con diferente perfil en AG no encuentran diferencias en los parámetros productivos de los pollos de carne (Crespo y Esteve-García ,2002a; Sanz et al., 1999). En cuanto al nivel de alimentación, las aves crecían más al incrementar el consumo y la ingestión de energía.

En la tabla 2, presentamos los resultados relativos al balance de energía, expresados en kJ por ave y día. Se puede observar la energía metabolizable aparente ingerida (EMAI) y la energía retenida (ER) en función de los distintos tratamientos. En relación al plan de alimentación, lógicamente, conforme aumentamos el nivel de ingestión se incrementa la ER, AG totales AGT y proteína. En relación al tipo de grasa, podemos observar que la EMAI fue similar para los animales, independientemente de que consumieran grasa saturada o poliinsaturada.

Tabla 1. Resultados productivos de pollos de carne alimentados con distintos tipos de grasa y niveles de alimentación durante los 21 días del periodo experimental¹

Tratamientos ²	Peso final g	Consumo medio diario g/ave/día	Ganancia media diaria g/ave/día	Índice de transformación
SA	2921,6a	158,21a	78,56a	2,01a
S80	2452,2b	116,85b	56,09b	2,08b
S60	2091,0c	95,09c	37,77c	2,52c
S40	1666,0d	63,39d	17,36d	3,65d
LA	2831,9a	140,66a	74,61a	1,89a
L80	2485,1b	121,34b	56,98b	2,13b
L60	2098,5c	92,29c	38,17c	2,4c2
L40	1645,4d	62,06d	17,40d	3,57d
RSD ³	146,5	8,74	7,18	0,38
P-value				
TIPO	NS	NS	NS	NS
NIVEL	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Interacción	NS	NS	NS	NS

¹Valores que corresponden a las medias de los animales por tratamiento (n= 8).

²S: Piensos con 10% de Sebo; L: Piensos con el 10% de linaza; A: administración ad libitum; 80: administración restringida a 80% ad libitum; 60: administración restringida a 60% ad libitum; 40: administración restringida a 40% ad libitum.

³RSD: Desviación estándar residual.

Tabla 2. Balance de energía, ácidos grasos totales (AGT) y Proteína bruta (PB) en función del tipo de grasa y nivel de alimentación (de 28 a 49 días de edad), expresado por pollo y día¹

Tratamiento ²	EMA ingerida kJ/pollo/d	Energía retenida ³ kJ/pollo/d	AGT digestibles ingeridos g/pollo/d	AGT retenidos ³ g/pollo/d	P B ingerida g/pollo/d	P B retenida ³ g/pollo/d
SA	2077,1a	897,61a	13,577a	10,08a	33,16a	13,60a
S80	1550,8bc	554,99b	9,74c	5,40b	24,52b	10,78b
S60	1254,9d	317,76c	7,96c	2,46c	19,95c	8,54c
S40	814,5e	115,77d	5,10d	0,17d	13,30d	5,18d
LA	1976,3a	795,18a	13,23a	4,53b	30,35a	13,19a
L80	1722,0b	600,26b	11,39b	2,50c	26,08b	11,32b
L60	1310,6cd	341,60c	8,47c	1,11cd	19,92c	8,01c
L40	865,0e	138,80d	5,49d	-0,60d	13,39d	4,70d
RSD ⁴	126,71	77,65	0,841	0,985	1,86	1,45
P-value						
TIPO	NS	NS	0,004	<0,001	NS	NS
NIVEL	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Interacción	0,045	NS	0,020	<0,001	0,032	NS

¹Valores que corresponden a las medias de los animales por tratamiento (n= 8).

²S: Piensos con 10% de Sebo; L: Piensos con el 10% de linaza; A: administración ad libitum; 80: administración restringida a 80% ad libitum; 60: administración restringida a 60% ad libitum; 40: administración restringida a 40% ad libitum.

³X retenida= X del pollo entero al final experimento – X del pollo entero al inicio experimento.

⁴RSD: Desviación estándar residual.

En cuanto al balance de grasa, los animales que consumen grasa saturada tienen menor ingestión de grasa digestible que los animales del tratamiento L, ya que las grasas saturadas frente a las poliinsaturadas tienen un menor porcentaje de digestibilidad. Sin embargo, los animales que consumen grasa saturada retienen más grasa en el cuerpo que los pollos que consumen grasa poliinsaturada (SA: 10.08 vs. LA: 4,53 g AGT/ave/día; $P > 0,001$). De hecho depositan prácticamente el 80 % de lo que han absorbido. Por el contrario, las aves que consumen raciones con mayor grado de poliinsaturación retienen menos grasa de la que han aparentemente absorbido (L: 36%). Crespo y Esteve-García (2002b), también observaron resultados similares a los encontrados en este estudio. Por su parte, Sanz et al. (2000), utilizando dos fuentes de grasa (saturada e insaturada), determinaron una mayor retención de energía para los animales alimentados con grasas saturadas. Sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran que la utilización de grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados da lugar a menor retención de grasa que no fue acompañada de cambios en la retención de energía ni de proteína en el pollo de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Crespo, N. y Esteve-García, E. (2002a). *Poult.Sci* 81: 512-518.
Crespo, N. y Esteve-García, E. (2002b). *Poult.Sci* 81: 1533-1542.
National Research Council Nutrient (NRC) (1994) National Academy Press. Washington DC, EUA.
Sanz, M., Flores, A. y López-Bote, C.J. (1999a). *Poult.Sci* 78: 378-382.
Sanz, M., Flores, A., De Ayala, P.P. y López-Bote, C.J. (1999b). *British Poultry Science* 40: 95-101.
Sanz, M., Lopez-Bote, C.J., Menoyo, D. y Bautista, J.M. (2000). *J.Nutr.* 130: 3034-3037.
Villaverde, C., Baucells, M.D., Cortinas, L., Hervera, M. y Barroeta, A. C. (2005). *Archives of Animal Nutrition* 59: 281-292.

EFFECT OF DIETARY FATTY ACID PROFILE ON ENERGY AND FAT RETENTION IN BROILER CHICKENS

ABSTRACT: The aim of the present study was to determine the effect of different dietary fatty acid profile on the efficiency of energy, protein and fat retention in broiler chickens. A total of 64 female broiler chickens were randomly distributed into 8 different treatments, split up from 2 x 4 factorial arrangement with 2 different diets containing either 10 % of tallow (T) or 10% of linseed oil (L) and 4 feeding levels: *ad libitum* (A); or restricted at 80%, 60% or 40% respect to (A). Excreta were quantitatively collected from 28 to 49 days of age and animals were slaughtered at the start and at the end of the trial in order to calculate the retention efficiency. A reduction in body fat deposition was observed in the animals fed the L diet from those fed the S diet (SA: 10.08 vs. LA: 4.53 gAGT/b/d; $P > 0.0001$). However, neither the protein (SA: 13.60 and LA: 13.19 g/b/d; NS) nor the energy retained (SA: 897.61 and LA: 795.18 kJ/d/d; NS) were significantly different between animals fed SA and LA diets.

Keywords: *fatty acid, energy retention, fat deposition*

DIGESTIBILIDAD DE DIETAS CON DISTINTAS RELACIONES DE FIBRA MUY DIGESTIBLE/POCO DIGESTIBLE EN CONEJOS DE CEBO: CONTRIBUCIÓN DE LOS TRAMOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Rodríguez-Romero, N., Abecia, L., Rodríguez, R., Balcells, J. y Fondevila, M.
Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza,
Miguel Servet 177, 50013. Zaragoza. mfondevi@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La fibra de la dieta juega un papel importante en la fisiología digestiva del conejo. La fibra muy digestible (hemicelulosas y pectinas; FD) es un potente activador de fermentación cecal, y la poco digestible (fibra ácido detergente, FAD) favorece el tránsito a través del tracto gastrointestinal. Sin embargo, no está clara la proporción de cada una que optimice la digestibilidad de la dieta. El objetivo de este estudio es analizar el efecto de la relación FD/FAD sobre la digestibilidad de la materia seca (DMS) en conejos de cebo, así como el papel que desempeñan los distintos tramos del tracto digestivo en el proceso.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en tres periodos experimentales consecutivos de 21 días. Se seleccionaron 24 gazapos de raza Neozelandesa (8 animales por periodo), de $629 \pm 80,21$ g de peso, recién destetados (28 días de edad), que se distribuyeron al azar en cuatro dietas experimentales. Los animales recibieron las dietas *ad libitum* durante 14 días de adaptación y 7 días de toma de muestras. Las dietas experimentales fueron formuladas en base a dos niveles de FD y dos de FAD, en un diseño factorial 2x2, considerando el periodo experimental como bloque. La composición de las dietas experimentales se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química (g/kg materia seca, MS) de las dietas experimentales y del alimento predigerido utilizado en la fase de fermentación

Contenido ²	Tratamientos							
	Dieta 1 13/26 ¹		Dieta 2 13/33 ¹		Dieta 3 18/26 ¹		Dieta 4 18/33 ¹	
	Inicial	Predig	Inicial	Predig	Inicial	Predig	Inicial	Predig
MS ³	915	928	915	926	916	908	916	911
PB ³	145	59	152	56	145	61	144	51
FND ⁴	361	676	438	716	367	653	450	721
FAD ⁴	258	528	327	586	254	502	330	569
LAD ⁵	96	231	153	312	106	214	157	296
Pectinas ⁶	26		26		60		60	
FD	129		137		173		180	
Almidón ⁶	129		87		87		30	

¹Relación FD/FAD; ²PB: proteína bruta, FND: fibra neutro detergente, FAD: fibra ácido-detergente, FD: fibra digestible (hemicelulosas + pectinas); ³AOAC (2000); ⁴Ankom Technology, AOAC (2000); ⁵Van Soest *et al.* (1991); ⁶Estimado a partir de Blas *et al.* (1994).

La DMS se determinó *in vivo*, en jaulas metabólicas individuales (dos gazapos por tratamiento en cada periodo experimental) en ambiente controlado (18-24°C y 12/12 horas de luz/oscuridad), con dos días de acostumbamiento y cuatro días de colección total de heces y residuos de alimento. El séptimo día se determinó la excreción de cecotrofos durante 24 h mediante la colocación de collares cervicales.

Una vez finalizado el balance de digestibilidad, los animales permanecieron recibiendo las mismas dietas durante 24 h para recuperar el ambiente cecal. A continuación, se sacrificaron y se les extrajo el contenido del ciego, que se pesó y empleó como inóculo en la prueba de fermentación *in vitro*. Para ello, se emplearon botellas de vidrio con 80 ml de solución de incubación (Theodorou *et al.* 1994, con modificaciones de Mould *et al.* 2005),

incluyendo un 10% de inóculo cecal. Como sustrato se emplearon 0,800 g de muestras de las mismas dietas predigeridas sucesivamente en pepsina-HCl y en pancreatina (Boisen y Fernández, 1997), para simular los procesos de digestión previos al ciego. La composición de los sustratos predigeridos figura también en la Tabla 1. Se incubaron tres botellas por gazapo, dos con sustrato, y otra sin sustrato (blanco). La incubación se llevó a cabo a 39°C durante 18 horas, estimándose el volumen de gas producido en función de la presión interna de la botella. Al finalizar la incubación, se filtró el residuo de fermentación a través de 45 µm para determinar la desaparición de la materia seca (dMS). Paralelamente, se determinó la digestibilidad enzimática de las dietas mediante el método de tres fases de Boisen y Fernández (1997).

Los datos individuales para cada método de análisis fueron analizados mediante el procedimiento GLM del SAS (versión 8.2) y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. Se utilizó el método de regresión lineal (PROC REG) para obtener la ecuación de predicción de DMS *in vivo* por el método enzimático cecal y producción de gas a las 18 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se detectaron interacciones significativas ($P > 0.05$) entre los niveles de FD/FAD para ninguno de los parámetros a estudio (Tabla 2). Una mayor proporción de FAD en la dieta produjo una disminución ($P < 0.05$) de la DMS *in vivo*, mientras que no se observó un efecto de la proporción de FD ($P > 0.05$). Bajos valores de digestibilidad podrían estar asociados a una baja ingestión (Fernández-Carmona *et al.* 1996), asociada a un nivel alto de FAD en la dieta. En este sentido, las dietas con altas proporciones de FAD también indujeron un mayor contenido cecal, e igualmente se observó una mayor excreción de cecotrofos en las dietas con mayor nivel de FAD, independientemente del nivel de FD. Según análisis de correlación, una menor DMS está relacionada a una mayor producción de cecotrofos ($r = -0.40$; $P = 0.039$).

Tabla 2. Digestibilidad de la materia seca (DMS, %), peso del contenido cecal (g), excreción de cecotrofos (g MS/d) y estimación de la contribución a la digestión del tracto previo al ciego (incubación en pepsina-pancreatina) y del ciego (digestión enzimática, %; producción de gas a las 18 horas, ml/g MS y desaparición de materia seca, dMS cecal, %) con diferentes proporciones de fibra digestible/ indigestible en la dieta

	Tratamientos				e.e.	Probabilidad	
	Dieta 1 13/26 ¹	Dieta 2 13/33 ¹	Dieta 3 18/26 ¹	Dieta 4 18/33 ¹		FD ²	FAD ³
DMS	51.2 ^a	43.9 ^b	52.4 ^a	44.4 ^b	0.66	NS	<0.001
Contenido cecal	58.8 ^c	70.4 ^b	64.9 ^{bc}	83.7 ^a	3.19	0.007	<0.001
Cecotrofos	19.2 ^b	24.6 ^{ab}	21.0 ^{ab}	26.4 ^a	2.08	NS	0.018
Pepsina-pancreatina	46.4	37.9	40.5	33.0	---	---	---
Dig. enzimát. cecal	12.3	12.2	19.9	19.1	---	---	---
Prod. de gas	37.3 ^b	27.5 ^c	47.0 ^a	39.9 ^b	1.07	<0.001	<0.001
dMS cecal	14.1 ^b	14.2 ^b	22.5 ^a	18.7 ^{ab}	2.09	0.005	NS

¹Relación FD/FAD; NS: no significativo. Superíndices distintos en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$); ²FD: fibra digestible; ³FAD: fibra ácido detergente.

Aunque la digestibilidad enzimática (Boisen y Fernández, 1997) fue entre 6 y 8 puntos porcentuales superior a la DMS *in vivo* (valores medios de 58,8, 50,0, 60,4 y 52,1 para las Dietas 1, 2, 3 y 4, respectivamente), al igual que lo observado por Pascual *et al.* (2000), el comportamiento fue similar, por lo que se considera válida la estimación de la digestibilidad en el tracto digestivo pre-cecal y cecal a partir de los resultados de las dos primeras fases (digestión con pepsina-pancreatina) y de la tercera (Viscozyme), respectivamente. Según los valores observados, el 78,4% de la digestibilidad total de las dietas tuvo lugar antes del ciego, siendo del 86,0 y 81,3% para los niveles bajos de FD (dietas 1 y 2) y disminuyendo

con 33% FD a 74,7 y 71,6% para su combinación con baja y alta FAD (dietas 3 y 4), respectivamente.

Aunque la dMS cecal mostró una respuesta positiva a la proporción de FD, independientemente del nivel de FAD, lo que se observó igualmente en la digestibilidad enzimática cecal, la producción de gas mostró un descenso en la fermentación al aumentar la proporción de FAD para ambos niveles de FD, al tiempo que el volumen de gas producido fue mayor en las dietas con más fibra digestible. Estos resultados parecen complementarse con la digestibilidad enzimática en pepsina-pancreatina. Las diferencias entre la estimación gravimétrica (dMS) y por producción de gas de la fermentación cecal pueden atribuirse a la contribución de la masa microbiana al residuo de fermentación en el primer caso. Además, es de destacar la elevada magnitud del error en dMS (coeficientes de variación del 6,9 y del 29,5% para producción de gas y dMS, respectivamente).

A pesar de las diferencias en los procesos de digestión previos al ciego, la producción de gas mostró una correlación significativa con la DMS *in vivo* ($y=34,954 + 0,340x$; $R=0,59$; $n=24$; $P=0,003$), lo que sugiere el potencial de este método como estimador de la digestibilidad en conejos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. 2000. 17th Edition. *Association of Official Analytical Chemist, Arlington, USA*.
- Blas, E., Cervera, C., Fernández-Carmona, J. 1994. *World Rabbit Science*. 2:117-121.
- Boisen, S., Fernandez, J. A. 1997. *Anim. Feed Sci. Technol.* 68:277-286.
- Fernández-Carmona, J., Cervera, C., Blas, E. 1996. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:61-75.
- Mould, F. L., Morgan, R., Kliem, K. E. Krystallidou, E. 2005. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:155-172.
- Pascual, J. J., Cervera, C., Fernández-Carmona, J. 2000. *World Rabbit Science*. 8:93-97.
- SAS. Version 8.2. *Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC*.
- Theodorou, M. B., Williams, A., Danoa, M., McAllan, A. B., France, J. 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL 2006-07596/GAN del Ministerio de Educación y Ciencia. N. Rodríguez-Romero disfruta de una beca predoctoral de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (Venezuela); R. Rodríguez (ICA, Cuba) está financiado por una beca MAEC.

DIGESTIBILITY OF DIETS WITH DIFFERENT PROPORTIONS OF HIGH/LOW DIGESTIBLE FIBRE FOR GROWING RABBITS: ROLE OF THE PARTS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

ABSTRACT: *In vivo* apparent digestibility (DMD) of diets with two proportions of digestible fibre (DF, 13 and 18%) and acid detergent fibre (ADF, 26 and 33%) were studied in a 2x2 factorial design with six weaned rabbits (28 days) per treatment. Despite the level of DF ($P>0.05$), DMD was higher with the lower level of ADF. The extent of digestion before the caecum with pepsin-pancreatin and in the caecum as dry matter disappearance (DMd) and gas production in 18h *in vitro* incubation, and with Viscozyme was also estimated. Digestion before the caecum reached a higher extent with the lower level of ADF. Gas production fitted well with these results, whereas caecal DMd only showed differences between levels of DF. Despite differences induced by digestive processes previous to the caecum, gas production by *in vitro* fermentation with caecal inoculum was correlated ($R=0.59$; $P=0.03$) with *in vivo* DMD.

Keywords: *growing rabbits, digestibility, pepsin-pancreatin, caecal fermentation*

DIETAS FIBROSAS EN CONEJAS DURANTE LA RECRÍA: I CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LEPTINA Y GLUCOSA

Rebollar, P.G.¹, Millán, P.², Nicodemus, N.¹, Marchán, F.¹ y Lorenzo, P.L.²

¹Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. pilar.grebollar@upm.es. ²Departamento de Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

Dado que la reproducción es una de las funciones vitales que demandan más energía, un desequilibrio energético repercute de inmediato en ella y especialmente, si se trata de una etapa de la vida del animal en la que tiene que completar su crecimiento. Las dietas fibrosas tienen la ventaja de que se pueden suministrar cómodamente *ad libitum* en recría, y como suelen tener menor aporte energético, no hay riesgo de engrasamiento (Xiccato et al., 1999). La leptina es una señal metabólica que controla el incremento en la secreción de GnRH en la pubertad (Moschos et al., 2002) y la glucosa es un buen indicador del balance energético de los animales (Chilliard et al., 1998). En este trabajo se estudió el efecto sobre la evolución de estos parámetros séricos en la pubertad y primera gestación en conejas alimentadas durante la recría con dos piensos fibrosos que difirieron en el contenido de energía digestible, proteína e hidratos de carbono.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 20 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) híbridas (Neozelandés blanco x Californiano), fueron alojadas en la granja experimental de la E.T.S.I. Agrónomos de Madrid (20-25 °C, 16 HL: 8 HO). Desde las 11 semanas de edad hasta el primer parto se distribuyeron en dos grupos a los que se suministró dos piensos con un 40% de fibra neutro detergente (FND) (sobre %MS) (Cargill S.A.):

- Grupo A: 10 conejas recibieron un pienso con un 19.1% de Proteína Bruta (PB), un 6,6% de Fibra Soluble (FS), un 14,6% de almidón sobre MS y 11,6 MJ energía digestible/kg MS, suministrado durante todo el periodo experimental.
- Grupo B: 10 animales recibieron un pienso con un 16,8% de PB, un 9,01% de FS, un 17,9% de almidón sobre MS y 9,1 MJ energía digestible/kg MS, suministrado *ad libitum* desde las 11 semanas de edad hasta el primer parto. Tras el parto consumieron el pienso A.

A las 16 semanas de edad se inseminaron con semen fresco y se les indujo la ovulación con gonadorelina (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero). Todas quedaron gestantes y tras el parto (semana 20), se igualaron las camadas a 10 gazapos. Se tomaron un total de 7 muestras de sangre por punción de la arteria medial de la oreja (9:00–10:00 a.m.), en las semanas 11, 14, 16, 18, 20 y 21 de edad coincidiendo con estados puberales, de gestación y de inicio de lactación.

La determinación de leptina se realizó mediante RIA (Multi-species Leptin RIA, Linco Research) y la glucosa, midiendo la absorbancia del color desarrollado tras un periodo de incubación con las enzimas Glucosa Oxidasa y Peroxidasa.

Los resultados se han analizado mediante un análisis de medidas repetidas utilizando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1990). Los efectos fijos fueron las dietas experimentales, el tiempo o momento en el que se realizó la determinación del parámetro sérico y sus interacciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos se encuentran dentro de los niveles fisiológicos de esta especie (Brecchia et al., 2006). El pienso suministrado durante la recría no afectó a los niveles medios de leptina (3,4 ng/ml). Sin embargo, las conejas del grupo B presentaron

concentraciones de glucosa más altas que las conejas del grupo A (142 mg/dl y 122 mg/dl, respectivamente, Figura 1; $P < 0,0001$), posiblemente porque el contenido en almidón del pienso B era más elevado (17,9 % vs. 14,6 % de MS).

El tiempo o edad de la coneja influyó significativamente en los dos parámetros séricos ($P < 0,0001$). La glucemia descendió progresivamente a lo largo de la gestación posiblemente debido a la demanda fetal (Gilbert et al., 1984) y a la difusión facilitada de glucosa a través de la placenta. Dicha transferencia es cuantitativamente superior a la de otros metabolitos (aminoácidos), ya que éstos necesitan un transporte activo. Este descenso fue más acusado en las conejas del grupo A ($P < 0,05$), en la tercera semana de gestación (19s), en la que se ha descrito un incremento de las necesidades del útero grávido (Parigi-Bini, 1988).

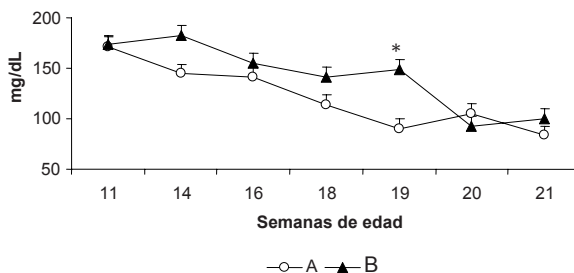


Figura 1. Evolución de las concentraciones de glucosa (*: $P < 0,05$)

Los valores intermedios de leptina obtenidos a las 11 semanas de edad (Figura 2) concuerdan con los observados en etapas prepuberales (Nicodemus et al., 2007), siendo más altos a las 16 semanas, coincidiendo con estudios previos (Boiti, 2004; Nicodemus et al., 2007), y con el final de la pubertad e inicio de la madurez sexual.

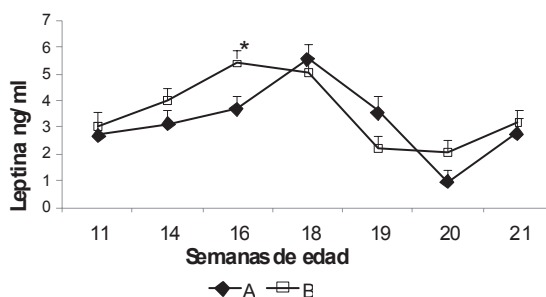


Figura 2. Evolución de las concentraciones de leptina (*: $P < 0,05$)

En las conejas del grupo A se observó cierto retraso en la llegada al máximo de leptina en pubertad (16s; $P < 0,05$) y presentaron un descenso ligeramente más acusado en el momento del parto (20s; $P = 0,01$). Debray et al. (2002) han descrito que, en la época de cebo, un 17% de almidón en el pienso incrementa la cantidad de alimento ingerido y el peso de los animales y disminuye la mortalidad, frente a piensos con un 14%. Resultados similares descritos por Nicodemus et al. (2005) confirman que se observa una mayor capacidad de ingestión en gazapos cuando las dietas suministradas tienen altos porcentajes de almidón. Hasta la tercera semana de gestación, el consumo de alimento de las hembras aumenta (+25 a +50%) y hasta ese momento las necesidades para el crecimiento fetal suelen ser bajas, por lo que el balance energético de las madres es positivo (Parigi-Bini et al., 1990). Esto se traduciría en un aumento de las reservas corporales lipídicas y por tanto explicaría

las altas concentraciones de leptina en la semana 18 de edad, coincidiendo con la 2ª semana de gestación. En cambio, en las dos últimas semanas de gestación (19 y 20s), las necesidades energéticas para el desarrollo fetal aumentan bastante. Existe una transferencia de la grasa corporal hacia el feto, una reducción de la ingestión de alimento en los días que preceden al parto y, en consecuencia, un balance energético negativo en este periodo. En estudios realizados por Brecchia et al. (2006), se ha observado que cuando las conejas se someten a periodos de 24 ó 48 horas de ayuno, se instaura un claro descenso en las concentraciones de leptina. Algo similar debe suceder a partir de la tercera semana de gestación (19s), ya que en nuestro estudio la leptina llega a niveles mínimos pocos días previos al parto (20s). El mecanismo por el cual los niveles de leptina descienden cuando la coneja sufre un descenso en el consumo de alimento parece ser que es porque la secreción de leptina no sólo está regulada por la existencia de mayor o menor cantidad de tejido adiposo, sino que también es importante la disponibilidad de nutrientes potencialmente oxidables como la glucosa (Wang et al., 2001), que en este caso es muy baja. En la primera semana de lactación (21s), la leptinemia ascendió a niveles intermedios. La coneja empieza a producir cantidades de leche todavía no muy elevadas y recupera tímidamente los niveles de leptina, probablemente porque el consumo de alimento aumenta un 60-75% (Parigi-Bini et al., 1990), intentando compensar las necesidades ligadas al mantenimiento y a la producción de leche.

De los resultados de este trabajo se puede concluir que una reducción de los niveles de proteína en base a un aumento de la proporción de fibra soluble y almidón en los piensos de conejas suministrados durante recría mejora su estado metabólico. Las concentraciones séricas de glucosa y leptina descritas en este trabajo son buenos indicadores del estado metabólico en las conejas de recría.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boiti C., 2004. 8th WRC, México, Vol. 1, 186-206. ● Brecchia, G., Bonanno, A., Galeati, G., Federici, C., Maranesi, M., Gobetti, A., Zerani, M., Boiti, C., 2006. Dom. Anim. Endocrinol., 31, 105-122. ● Chillard Y., Bocquier F., Doreau M. 1998. Reprod. Nutr. Dev., 38, 131-152. ● Debray, L., Fortun-Lamothe, L., Gidenne, T., 2002. Anim. Res., 51, 63-75. ● Gilbert, M., Hay, W. W., Johnson, R. L., Battaglia, F.C., 1984. Pediatr. Res., 18, 854-859. ● Moschos, S., Chan, J.L., Mantzoros, C.S., 2002. Fertil. Steril., 77, 433-444. ● Nicodemus N., Gómez-Conde M.S., Chamorro S., Rodríguez J.D. García J., de Blas J.C., 2005. XXX Symposium de Cunicultura of ASESCU, Valladolid, Spain, 107-113. ● Nicodemus N., Fernández B., Millán P., Pereda N., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2007. XII Jornadas sobre producción animal. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, ITEA Vol. Extra nº28. Tomo I, (75-77). ● Parigi-Bini, R., 1988. 4th WRC, Vol. 3 1-29. ● Parigi-Bini, R., Xiccato G., Cinetto, M., 1990. Cuniscience, 6, 19-29 ● SAS Institute 2001. SAS/STAT ® User's Guide (Release 8.2), SAS Inst. Inc., Cary NC, USA. ● Xiccato, G., Bernardini, M., Castellini, C., Dalle Zotte, A., Queaque, P.I., Trocino, A., 1999. J. Anim. Sci., 77, 416-426. ● Wang, J., Obici, S., Rossetti, L., Morgan, K., Barzilal, N., Feng, Z., Diabetes 50, 2786-2791.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CICYT, AGL- 05-0196 y 07-60168.

RABBIT DOES FED WITH FIBROUS DIETS DURING REARING: I SERUM LEPTINE AND GLUCOSE CONCENTRATIONS

ABSTRACT: In this study, leptin and glucose serum concentrations during puberty and first pregnancy were determined in young rabbit does fed with two diets with 40% NFD (%DM basis) and high protein-low starch and soluble fibre (A) or low protein-high starch and soluble fibre (B). These parameters are good indicators of the animal metabolic status, which improved when young rabbit does were fed diet B during rearing.

Key words: rabbit, rearing, leptin, glucose.

DIETAS FIBROSAS EN CONEJAS DURANTE LA RECRÍA: II CONCENTRACIONES SÉRICAS DE NEFA Y PROTEÍNAS TOTALES

Rebollar, P.G.¹, Millán P.², Lorenzo, P.L.², Marchán, F.¹ y Nicodemus N.¹

¹ Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. pilar.grebollar@upm.es. ² Departamento de Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos libres no esterificados (NEFA) se liberan a la corriente sanguínea para servir de combustible metabólico cuando se produce un déficit de glucosa. Como resultado, se libera glucagón y se produce la activación de la lipasa que hidroliza los triglicéridos. Por lo tanto, los NEFA derivados de la movilización de las reservas corporales en la sangre, podrían ser un buen indicador del balance energético. Su aumento suele coincidir con un déficit en el aporte energético de la ración (Greppy et al., 1995; Brecchia et al., 2006; Rios et al., 2006). Las proteínas séricas son muy importantes en el metabolismo general del animal debido a su estrecha relación con el hígado, en cuanto a que es su lugar de síntesis, y a que están en continuo intercambio con las proteínas de otros tejidos (Coles, 1986).

En este trabajo se estudió el efecto sobre la evolución de estos parámetros séricos en la pubertad y primera gestación en conejas alimentadas durante la recría con dos piensos fibrosos que difirieron en el contenido de energía digestible, proteína e hidratos de carbono.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 20 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) híbridas (Neozelandés blanco x Californiano), fueron alojadas en la granja experimental de la E.T.S.I. Agrónomos de Madrid (20-25 °C, 16 HL: 8 HO). Desde las 11 semanas de edad hasta el primer parto se distribuyeron en dos grupos a los que se suministró dos piensos con un 40% FND (sobre %MS) (Cargill S.A.):

- Grupo A: 10 conejas recibieron un pienso con un 19,1% de Proteína Bruta (PB), un 6,6% de Fibra Soluble (FS), un 14,6% de almidón sobre MS y 11,6 MJ energía digestible/kg MS, suministrado durante todo el periodo experimental.
- Grupo B: 10 animales recibieron un pienso con un 16,8% de PB, un 9,01% de FS, un 17,9% de almidón sobre MS y 9,1 MJ energía digestible/kg MS, suministrado *ad libitum* desde las 11 semanas de edad hasta el primer parto. Tras el parto consumieron el pienso A.

A las 16 semanas de edad se inseminaron con semen fresco y se les indujo la ovulación con gonadorelina (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero). Todas quedaron gestantes y tras el parto (semana 20), se igualaron las camadas a 10 gazapos. Se tomaron un total de 7 muestras de sangre por punción de la arteria medial de la oreja (9:00–10:00 a.m.), en las semanas 11, 14, 16, 18, 20 y 21 de edad coincidiendo con estados puberales, de gestación y de inicio de lactación.

Para el análisis de las proteínas totales contenidas en el suero se utilizó el método Biuret. La determinación de NEFAS se llevó a cabo mediante el uso del kit de NEFA C de Wako.

Los resultados se han analizado mediante un análisis de medidas repetidas utilizando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1990). Los efectos fijos fueron las dietas experimentales, el tiempo en el que se realizó la determinación del parámetro sérico y sus interacciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones séricas de NEFA y proteínas totales estudiadas se encuentran dentro de los límites fisiológicos de esta especie (Brecchia et al., 2006; Melillo, 2007). El pienso suministrado durante la recría no afectó a ninguno de los parámetros, pero el tiempo influyó significativamente en ambas (Figuras 1 y 2).

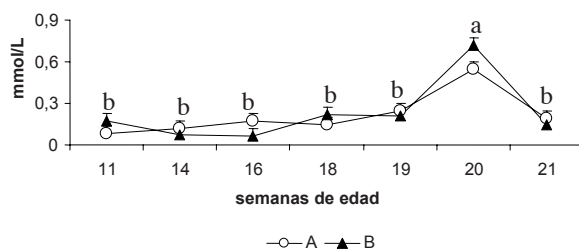


Figura 1. Evolución de las concentraciones de NEFA en conejas (a, b: $P < 0,001$)

Los NEFA son la parte de la reserva total de ácidos grasos que pueden ser utilizados de forma inmediata para cubrir las necesidades metabólicas. Cuando las cantidades de glucosa son insuficientes, tal y como ocurre al final de la gestación, pueden ser absorbidos fácilmente por los músculos, el corazón, el cerebro y otros órganos como fuente de energía. Cuando los niveles de glucosa en sangre son altos, las concentraciones de NEFA caen, y viceversa. En periodos de ayuno prolongado, los NEFA pueden aumentar hasta tres veces por encima de los valores normales (Brecchia et al., 2006). En nuestro estudio los niveles fueron relativamente bajos hasta el final de la gestación (18 y 19s) donde comenzaron a ascender hasta llegar a su máximo nivel en días previos al parto (20s), tras el cual descendieron drásticamente. Se ha demostrado que hay un aumento de la lipogénesis en todas las estructuras maternas hacia la mitad de la gestación (especialmente hígado y tejido adiposo), estando aumentada la actividad de la lipoproteína-lipasa del tejido adiposo de la madre. La activa lipogénesis, unida al incremento en la captación de lípidos circulantes por el tejido adiposo de la madre, justifica el aumento en los depósitos de grasa que tiene lugar durante los dos primeros tercios de la gestación y que coinciden con bajos niveles de NEFA en sangre. Sin embargo, hacia el final del segundo tercio se ha descrito un aumento en los triglicéridos y ácidos grasos libres en la circulación materna, con un ligero aumento en la actividad lipolítica del tejido adiposo que puede coincidir con la fase de crecimiento exponencial del feto (Devlin, 1986) y, por lo tanto, con un aumento de las necesidades energéticas. Todo esto también se explica por la menor capacidad de ingesta de alimentos por parte de la madre, al verse fuertemente reducida su capacidad abdominal, debido al crecimiento de los fetos. Esta menor ingesta, según Brecchia *et al.* (2006), desencadena un estado de hipoinsulinemia que impide la utilización de la glucosa como fuente de energía y estimula la lipólisis incrementando los niveles de NEFA en la última semana de gestación (20s). En el estudio presentado en estas mismas jornadas (Rebollar et al., 2009), el grupo de conejas A tuvo unas concentraciones medias de glucosa más bajas que el B. Sin embargo, este déficit no fue lo suficientemente negativo como para que se produjese en ellas un aumento de las concentraciones de NEFA con respecto al grupo B.

La concentración de proteínas se mantuvo en niveles fisiológicos y homogéneos durante prácticamente todo el experimento. Estos niveles en conejos se encuentran entre 5,4 y 7,5 g/dl (Melillo, 2007). Muchos factores como la edad, el estado reproductivo, la gestación, etc. pueden alterar las concentraciones de proteínas séricas. En este experimento los niveles fisiológicos se mantienen hasta llegar al parto (20s), donde se observó una clara hipoproteinemia.

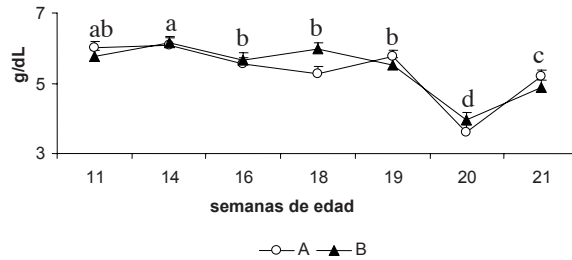


Figura 2. Evolución de las concentraciones de proteínas séricas en conejas (a, b: $P < 0,001$)

La hipoproteïnemia se puede instaurar por deshidratación o a malnutrición crónica (Melillo 2007). Según Deichmiller y Dixon (1960), cuando las conejas están gestantes, la proteína sérica de reserva del animal se agota, reduciendo su concentración a niveles basales (3,5-4,2%) en un período extremadamente corto (2-3 días). En nuestro experimento, la causa del descenso de las proteínas se observó de manera clara al final de la gestación, periodo que se caracteriza por una disminución en la ingestión de alimento. Además, según Melillo (2007), cuando el animal, por su avanzado estado de gestación, no puede realizar bien la cecotrofia, se reduce considerablemente la ingestión de una fuente de proteína muy importante que corresponde a un 25-30% del porcentaje de materia seca del cecotrofo (Kupersmith, 1998).

En conclusión, la evolución de las concentraciones séricas de NEFA y de proteínas con las dos dietas estudiadas fue similar y tuvieron un comportamiento inverso en el momento del parto. El estado metabólico del animal depende en gran medida de su estado fisiológico y los parámetros estudiados por sí solos no han sido capaces de cuantificar su variación, siendo necesarios otros indicadores (glucosa, leptina y condición corporal) que los complementen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brecchia, G., Bonanno, A., Galeati, G., Federici, C., Maranesi, M., Gobetti, A., Zerani, M., Boiti, C., 2006. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 31, 105-122.
- Coles, E.H. 1986. *En: Veterinary Clinical Pathology*. Ed. E.H. Coles. W.B. Saunders Company Philadelphia. pp 129-151
- Deichmiller, M. P., Dixon F.J., 1960. *J.Gen. Physiol.* Vol 43, p 1047.
- Devlin, T., 1986. *Bioquímica*. Tomo I. Ed. Revert., Barcelona, 678-679.
- Greppi, G.F., Ciceri, A., Pasquini, M. Falasch, U. Enne. G. 1995. *Proceedings of IDF- Seminar on Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk*. Greece 19-21.
- Kupersmith, D.1998. *Seminars in avian and exotic pet medicine*, 7, 141-147.
- Melillo, A. 2007. *J. Exotic Pet Med.*, 16, 135-145.
- Ríos, C., Marín, M. P., Catafau, M., Wittwer, F. 2006. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 38, 19-23.
- SAS Institute 2001. *SAS/STAT® User's Guide (Release 8.2)*, SAS Inst. Inc., Cary NC, EEUU.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CICYT, AGL 05-0196 y 07-60168.

RABBIT DOES FED WITH FIBROUS DIETS DURING REARING: II SERUM NEFA AND PROTEIN CONCENTRATIONS

ABSTRACT: In this study, serum protein and nonesterified fatty acid concentrations during rearing and first pregnancy were determined in young rabbit does fed with two diets with 40% NDF (%DM basis) and high protein-low starch and soluble fibre (A) or low protein-high starch and soluble fibre (B). Only these parameters are not enough to estimate the metabolic status, being necessary another indicators (glucose, leptin, body condition).

Key words: rabbit, rearing, serum protein, nonesterified fatty acids.

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON ACEITES DE GIRASOL Y PESCADO SOBRE EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE LOS ANIMALES Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE OVEJAS

Toral¹, P.G.*, Gómez-Cortés², P., Frutos¹, P., de la Fuente², M.A., Juárez², M., Hervás¹, G.

¹ Instituto de Ganadería de Montaña. CSIC-ULE. Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León

² Instituto del Frío. CSIC. José Antonio Novais 10. 28040 Madrid

*Correo electrónico: pg.toral@eae.csic.es

INTRODUCCIÓN

La suplementación de la dieta de los ruminantes con fuentes lipídicas puede mejorar el perfil de ácidos grasos (AG) de la leche y aumentar la concentración de compuestos potencialmente beneficiosos para la salud humana, como el ácido ruménico (RA; *cis-9 trans-11* C18:2), isómero mayoritario del ácido linoleico conjugado (CLA; Chilliard *et al.*, 2007).

Los aceites de origen marino son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) ω -3 de cadena larga que, al inhibir la reducción ruminal de los ácidos grasos *trans*-monoinsaturados, promueven la acumulación de ácido vacénico (VA; *trans-11* C18:1), precursor de la síntesis de RA en la glándula mamaria (Palmquist *et al.*, 2005). En la dieta de ganado vacuno, la inclusión de aceite de pescado más un aceite vegetal rico en ácido linoleico (a partir del cual se formaría VA en el rumen), como por ejemplo el de girasol, aumenta el contenido lácteo de RA y de PUFA ω -3, pero provoca el denominado síndrome de baja grasa en la leche (Shingfield *et al.*, 2006). En el ganado ovino lechero, donde existe escasa información relativa al uso de aceites marinos, Reynolds *et al.* (2006), mediante el uso de aceites de soja y algas, mejoraron el perfil lipídico de la leche de oveja sin apenas afectar a su rendimiento productivo. Por otra parte, un trabajo previo de nuestro grupo (Hervás *et al.*, 2008) mostró que, con la inclusión de aceite de girasol en la dieta de ovejas en lactación, se aumentaba tanto el contenido de CLA como el porcentaje de grasa de la leche.

El presente estudio se planteó, por lo tanto, con el objetivo de estudiar si la suplementación de la dieta de ovejas lecheras con una combinación de aceite de girasol y de pescado podía mejorar el valor nutricional de la leche sin perjudicar el rendimiento productivo de los animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este experimento se utilizaron 32 ovejas de raza assaf distribuidas en función de su nivel de producción de leche, peso vivo, días posparto y número de lactación, en 4 lotes (8 animales/lote) asignados a 2 tratamientos experimentales: dieta control sin suplementar (Control) o suplementada con una combinación de aceites de girasol y de pescado (G+P).

El experimento tuvo una duración de 4 semanas, durante las cuales los animales se alimentaron ad libitum con una dieta mixta (relación forraje:concentrado 20:80; PB=204 g/kg MS; FND=223 g/kg MS) que, en el caso del tratamiento G+P, estaba suplementada con un 2% de aceite de girasol más un 1% de aceite de pescado. Los animales fueron ordeñados dos veces al día y dispusieron en todo momento de agua limpia y de un bloque corrector vitamínico-mineral. La ingestión de alimento fue controlada semanalmente. Los días 0, 3, 7, 14, 21 y 28 de experimento se registró la producción de leche y se recogió una muestra individual para analizar su composición (proteína, grasa y extracto seco), así como otra de la mezcla de leche producida por cada lote para analizar su perfil de AG mediante cromatografía de gases (Hervás *et al.*, 2008).

El efecto del tratamiento de la dieta de los animales (D) y el del tiempo (T) se analizaron mediante un análisis de medidas repetidas en el tiempo, utilizando como covariable los datos obtenidos en el día 0. Para ello se utilizó el procedimiento MIXED del SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, EE.UU.). Las diferencias significativas se declararon con una $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La suplementación de la dieta de las ovejas con aceites de girasol y pescado (dieta G+P)

produjo una reducción significativa en la producción de leche, atribuible a la caída en la ingestión de MS observada en los animales que recibieron este tratamiento (Tabla 1), la cual no fue compensada por la mayor concentración energética de la ración. El efecto negativo del aceite de pescado sobre la ingestión de alimento ha sido observado tanto en vacuno como en ovino (Kitessa *et al.*, 2001; Shingfield *et al.*, 2006), mientras que el uso de aceite de girasol parece no tener efecto en ovino ni siquiera a dosis mayor que la utilizada en este trabajo (6%; Hervás *et al.*, 2008).

El tratamiento G+P produjo variaciones significativas en la composición de la leche, reduciendo su contenido en proteína ($P<0,05$), fenómeno frecuente al añadir lípidos a la dieta del ovino lechero (Pulina *et al.*, 2006). En relación al porcentaje de grasa, se observó una interacción D×T significativa debida al marcado aumento del contenido graso de la leche del tratamiento G+P al tercer día de experimento, para caer seguidamente respecto al grupo control. Aunque el ganado ovino lechero podría no verse afectado por el síndrome de baja grasa en la leche en la misma medida que el vacuno, el uso de aceite de pescado sí parece afectar negativamente al contenido de grasa láctea (Capper *et al.*, 2007), fundamentalmente con una dieta rica en concentrado como la utilizada en este estudio, pudiendo ser ésta una condición necesaria para producir dicho efecto en el ovino (Pulina *et al.*, 2006).

En este sentido, Sinclair *et al.* (2007) observaron que la suplementación con *trans*-10 *cis*-12 C18:2 encapsulado reduce el contenido graso de la leche en las ovejas de una forma similar al vacuno, aunque el uso de aceite de pescado no siempre va ligado a aumentos importantes del contenido de este isómero del CLA (Chilliard *et al.*, 2007), como se observa en este trabajo (ver Tabla 2). La adaptación de la microbiota ruminal al consumo de aceites produce cambios en las rutas de biohidrogenación ruminal que se ven reflejados en el aumento de la concentración en la leche de ciertos metabolitos intermediarios, como el *trans*-9 *cis*-11 C18:2, cuyo efecto sinérgico con el *trans*-10 *cis*-12 C18:2 podría ser la causa de la reducción del porcentaje de grasa láctea (Shingfield *et al.*, 2006).

Como cabía esperar, el contenido de RA y VA aumentó significativamente con el tratamiento G+P, alcanzado su valor máximo entre los días 3 y 7, para disminuir después ligeramente y mantenerse bastante estable durante el resto del experimento. Sin embargo el contenido de *trans*-10 C18:1 también aumentó de forma importante ($P<0,01$). Aunque la suplementación con aceites de girasol y pescado también produjo un incremento significativo del porcentaje de los ácidos eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) en la grasa láctea, la concentración final de ambos PUFA ω -3 fue relativamente baja, por su extenso metabolismo en el rumen y su baja tasa de transferencia a la leche (Chilliard *et al.*, 2007). Se produjo, por último, una reducción marcada del índice aterogénico ($P<0,05$) en los animales que recibieron el tratamiento G+P, por la significativa bajada del contenido en AG saturados en esta leche y el aumento del porcentaje de AG monoinsaturados y poliinsaturados.

En conclusión, la suplementación de la dieta del ganado ovino lechero con un 2% de aceite de girasol y un 1% de aceite de pescado aumentó el contenido de CLA y PUFA ω -3 en la grasa de la leche y redujo su índice aterogénico, si bien perjudicó el rendimiento productivo de los animales, reduciendo la producción de leche y su contenido en sólidos totales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Capper JL, Wilkinson RG, Mackenzie AM, Sinclair LA. 2007. *Animal* 1:889-898.
- Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, Bernard L, Rouel J, Doreau M. 2007. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828-855.
- Hervás G, Luna P, Mantecón AR, Castañares N, de la Fuente MA, Juárez M, Frutos P. 2008. *J. Dairy Res.* 75:99- 405.
- Kitessa SM, Gulati SK, Ashes JR, Fleck E, Scott TW, Nichols PD. 2001. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89:189-199.
- Palmquist DL, Lock A, Shingfield K, Bauman D. 2005. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol. 50. Taylor SL (Ed.) Elsevier Academic Press (USA). Pág. 179-217.
- Pulina G, Nudda A, Battacone G, Cannas A. 2006. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:255-291.
- Reynolds CK, Cannon VL, Loerch SC. 2006. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:333-357.
- Sinclair LA, Lock AL, Early R, Bauman DE. 2007. *J. Dairy Sci.* 90:3326-3335.
- Shingfield K, Reynolds CK, Hervás G, Griinari JM, Grandison AS, Beever DE. 2006. *J. Dairy Sci.* 89:714-732.

Tabla 1. Ingestión de MS, producción y composición de la leche de ovejas alimentadas con la dieta control (Control) o la suplementada con aceites de girasol más pescado (G+P).

	Dieta			Nivel de significación		
	Control	G+P	eed	D	T	D×T
Ingestión de MS (g/d)	3103	2521	79,5	0,018	<0,001	<0,001
Producción de leche (g/d)	2685	2321	70,6	0,040	<0,001	0,306
Composición (%)						
Proteína	5,20	4,76	0,045	0,011	<0,001	0,074
Grasa	5,91	5,16	0,174	0,050	0,012	<0,001
Extracto seco	16,92	15,73	0,162	0,018	0,022	<0,001

eed, error estándar de la diferencia; D, efecto de la dieta; T, efecto del tiempo.

Tabla 2. Perfil parcial de ácidos grasos (AG; % sobre AG totales) de la leche de ovejas alimentadas con la dieta control (Control) o suplementada con aceites de girasol más pescado (G+P).

	Dieta			Nivel de significación		
	Control	G+P	eed	D	T	D×T
C18:0	5,80	2,45	0,366	0,012	0,035	0,040
C18:1 <i>trans</i> -10	0,93	6,55	0,541	0,009	0,008	0,009
C18:1 <i>trans</i> -11 (VA)	1,58	8,05	1,356	0,041	0,024	0,021
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	2,64	2,49	0,033	0,011	0,006	0,022
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 (RA)	0,73	3,00	0,225	0,010	0,026	0,024
C18:2 <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11	0,02	0,10	0,014	0,029	0,082	0,081
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	<0,01	0,01	0,002	0,038	0,235	0,235
C18:3 n-3	0,33	0,26	0,014	0,048	<0,001	0,513
C20:5 n-3 (EPA)	0,02	0,12	0,010	0,012	0,160	0,155
C22:6 n-3 (DHA)	0,04	0,33	0,006	<0,001	0,028	0,024
AG saturados	75,11	58,70	0,936	0,003	0,056	0,050
AG monoinsaturados	19,90	31,81	0,828	0,005	0,032	0,035
AG poliinsaturados	4,68	7,58	0,255	0,008	0,040	0,048
Índice aterogénico	3,33	1,78	0,277	0,038	0,306	0,130

eed, error estándar de la diferencia; D, efecto de la dieta; T, efecto del tiempo.

Índice aterogénico = $(C12 + 4 \times C14 + C16) / (\sum \text{AG insaturados})$.

Agradecimientos: P. G. Toral y P. Gómez-Cortés disfrutaron de sendas becas predoctorales del CSIC (I3P) y del MICINN (FPI). Este trabajo ha sido financiado por el MICINN (AGL2008-04805) y la Junta de Castilla y León (Proyecto GR158).

EFFECT OF DIET SUPPLEMENTATION WITH SUNFLOWER AND FISH OILS ON ANIMAL PERFORMANCE AND MILK FATTY ACID PROFILE IN DAIRY EWES

ABSTRACT: This work was conducted to test the hypothesis that feeding a combination of sunflower oil plus fish oil would enhance the nutritional value of ovine milk without affecting animal performance. Thirty-two Assaf ewes were assigned to 2 treatments (2 lots of 8 animals per treatment): control (20:80 forage:concentrate ratio) or supplemented with 2% sunflower oil plus 1% fish oil (G+P), for 4 weeks. G+P diet remarkably increased the contents of *cis*-9 *trans*-11 C18:2 (from 0.73 to 3.00 g/100 g total fatty acids; FA) and *trans*-11 C18:1 (from 1.58 to 8.05 g/100 g total FA). Most changes in milk FA composition were addressed toward a healthier profile, resulting in a reduction of its atherogenicity index (-47%). However, oil supplementation decreased dry matter intake (-19%) and milk production (-14%), and affected milk composition, with reductions in protein (-8%) and fat contents (-13%). Milk fat reduction is discussed in terms of the joined action of several biohydrogenation intermediates.

Key words: lipid supplementation; PUFA; CLA; milk fat depression; sheep

INCORPORACIÓN DE ACEITES VEGETALES EN RACIONES DE OVEJAS CHURRAS DURANTE EL INICIO DE LACTACIÓN: EFECTO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y EL CRECIMIENTO DE LOS LECHAZOS

R. Bodas^{1*}, T. Manso², T. Castro³, V. Jimeno⁴, T. Román², A.R. Mantecón¹

¹ Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). 24346 Grulleros, León.
raul.bodas@eae.csic.es

²ETS Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. 34004 Palencia.

³ Dpto. Producción Animal. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

⁴ Dpto. Producción Animal. Universidad Politécnica de Madrid. 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

La utilización de grasas en las raciones de rumiantes permite modificar el perfil lipídico de los productos obtenidos (carne y leche) y ofrece la posibilidad de aumentar el nivel de algunos ácidos grasos poliinsaturados (CLA y ácidos grasos de la serie n-3) con efectos beneficiosos para la salud humana.

Estudios realizados en ovejas lecheras durante la fase intermedia de la lactación, han señalado que una de las formas más eficientes de aumentar los niveles de CLA y reducir la relación n6/n3 de la leche es la utilización de aceites vegetales en las raciones (Bouattour et al. 2007). Los trabajos publicados sobre la incorporación de aceites vegetales en ovejas lecheras durante el inicio de la lactación son limitados y, sin embargo, presentan un gran interés en razas de aptitud mixta, como la raza Churra, por su posible influencia en la calidad de la leche y de la carne de lechazo.

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de la incorporación de aceites vegetales con distinto grado de saturación, sobre la producción y composición de la leche de ovejas Churras durante el inicio de lactación y sobre el crecimiento de los corderos durante la fase de lactancia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 48 ovejas adultas de raza Churra, pertenecientes a la Granja de la Diputación de Palencia, con un peso vivo medio de 64,3 ± 0,92 kg y una condición corporal de 2,5.

Dos días después del parto las ovejas se asignaron, de forma equilibrada según la producción de leche en la lactación anterior, la prolificidad y el peso, a cuatro tratamientos experimentales de acuerdo con el aceite que recibieron en la ración: aceite de palma hidrogenado (Control), aceite de oliva, aceite de soja o aceite de linaza.

Las ovejas se alimentaron con una ración total mezclada (16% PB, 5,4% GB, 31% FND) compuesta por: alfalfa (40%), maíz (15%), cebada (17%), soja 44 (12%), pulpa de remolacha (9%), melaza (4%), el aceite correspondiente (3%) y corrector (1%). El perfil de ácidos grasos de los aceites utilizados figura en la Tabla 1.

Tabla 1. Aceites experimentales (% ácidos grasos totales)

	Palma	Oliva	Soja	Linaza
C16:0	66,2	10,6	11,3	6,2
C18:0	31,0	4,0	4,0	4,9
C18:1	0,1	76,8	24,1	21,9
C18:2	0,1	6,0	52,4	14,8
C18:3	<0.1	0,7	6,2	51,3

Cada oveja recibió 2,1 kg de MS/día de la ración mezclada correspondiente y un 10% de paja de cereales. La ración diaria se suministró repartida en dos veces. Los corderos, que permanecieron con sus madres desde el parto hasta que alcanzaron el peso al sacrificio, se pesaron dos veces por semana y se estimó la ganancia de peso diaria mediante regresión

lineal del peso vivo frente al tiempo. Las ovejas se ordeñaron una vez al día durante todo el periodo de lactancia de los corderos. La producción de leche se controló semanalmente y se tomaron muestras de leche para su posterior análisis en laboratorio. El contenido en proteína y grasa de la leche se determinó mediante un equipo MILKOSCAN. El perfil de ácidos grasos se determinó a partir de las muestras correspondientes a la segunda y cuarta semana de lactación. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 Series GC System, provisto de una columna HP-88, 100 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,2 µm de espesor de película. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS System.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se presentan los resultados correspondientes a la producción, composición y perfil de ácidos grasos de la leche, así como los datos relativos al crecimiento de los corderos pertenecientes a los distintos tratamientos experimentales.

Tabla 2. Producción, composición de la leche y crecimiento de los corderos

	Control	Oliva	Soja	Linaza	RSD	P
Producción y composición de la leche						
Producción (ml/24h)	1633	1626	1930	1404	588.1	0,197
Grasa %	4,84	5,58	5,20	4,18	1,587	0,170
Grasa g/d	82,1	97,9	90,2	58,1	44,74	0,155
Proteína %	4,74	4,77	4,57	4,86	0,374	0,311
Proteína g/d	76,6	76,3	87,6	67,6	25,95	0,319
Ácidos grasos (%)						
C14:0	11,78 ^a	10,33 ^b	10,27 ^b	11,97 ^a	1,508	0,007
C16:0	29,88 ^a	24,51 ^b	24,48 ^b	24,38 ^b	1,699	<0,001
C18:0	11,93 ^b	15,77 ^a	15,94 ^a	15,23 ^a	1,932	<0,001
C18:1 trans-11 (VA)	0,28 ^c	0,70 ^b	1,33 ^a	1,27 ^a	0,464	<0,001
C18:1 cis-9	20,59 ^c	26,90 ^a	23,76 ^b	21,48 ^{bc}	3,712	<0,001
C18:2 cis-9, cis-12	2,90 ^a	1,99 ^b	3,37 ^a	2,37 ^b	0,634	<0,001
C18:3-n3	0,61 ^b	0,62 ^b	0,64 ^b	1,28 ^a	0,299	<0,001
C18:2 cis-9, trans-11 (CLA, RA)	0,31 ^c	0,68 ^{bc}	1,47 ^a	1,12 ^{ab}	0,552	<0,001
SFA	72,12 ^a	65,28 ^b	64,69 ^b	67,36 ^b	3,664	<0,001
MUFA	23,32 ^c	30,66 ^a	28,44 ^{ab}	26,30 ^{bc}	3,959	<0,001
PUFA	4,02 ^b	3,59 ^b	6,12 ^a	5,59 ^a	0,895	<0,001
PUFA/SFA	0,06 ^c	0,06 ^c	0,10 ^a	0,08 ^b	0,014	<0,001
MPUFA/SFA	0,38 ^b	0,53 ^a	0,54 ^a	0,48 ^a	0,085	<0,001
n6/n3	5,16 ^{ab}	4,51 ^b	6,03 ^a	2,59 ^c	1,474	<0,001
Crecimiento de los corderos						
Peso al nacimiento (kg)	4,14	4,74	4,24	4,05	0,943	0,273
Ganancia media diaria (g-animal ⁻¹ .día ⁻¹)	274	280	259	258	53,2	0,760
PV a los 20 días (kg)	9,43	10,34	9,42	9,18	1,521	0,194

Superíndices distintos indican diferencias significativas (P<0,05)

El tipo de aceite incorporado no dio lugar a diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) en la producción y composición (grasa y proteína) de la leche. Algunos autores (Chilliard et al. 2001) han señalado reducciones en el nivel de grasa de la leche cuando se incorporan grasas insaturadas debido a alteraciones en la fermentación ruminal y a la producción de compuestos que inhiben la producción de grasa. No obstante, en el presente trabajo no se observó un efecto significativo en este sentido. Por otra parte, esta falta de

diferencias entre tratamientos experimentales tanto en la producción de leche como en el contenido en grasa y proteína de la misma podría explicar la ausencia de un efecto sobre el crecimiento de los corderos (Sanz Sampelayo et al., 1997)

El perfil de ácidos grasos de la leche estuvo directamente relacionado con el tipo de aceite incorporado en la ración. Así, las ovejas que recibieron aceite de palma hidrogenado produjeron leche con mayor contenido ($P<0,001$) en C16:0 y ácidos grasos saturados (SFA). Por otra parte, el aceite de oliva dio lugar a mayor contenido ($P<0,001$) en C18:1 cis-9 y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). El mayor contenido ($P<0,001$) en C18:2 cis-9, cis-12, C18:2 cis-9, trans-11 (RA), C18:1 trans-11 (VA), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y relación PUFA/SFA en la leche se observó en las ovejas que consumieron el aceite de soja, mientras que la leche de aquellas que recibieron aceite de linaza presentó el mayor porcentaje ($P<0,001$) de C18:3-n3 y la menor relación n6/n3 ($P<0,001$). Los niveles de VA y PUFA observados en las ovejas que recibieron el aceite de linaza fueron superiores ($P<0,001$) a los obtenidos con palma y oliva, pero no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos con el aceite de soja. El ácido ruménico (RA), al que se han atribuido numerosos efectos beneficiosos para la salud humana, se sintetiza en el rumen como producto intermediario en la biohidrogenación del ácido linoleico. El VA se produce durante la biohidrogenación del ácido linoleico y también del linoléico. La mayor parte del RA presente en la leche proviene de la desaturación del VA en la glándula mamaria (Chilliard et al. 2001), lo que podría explicar la ausencia de diferencias en las proporciones de CLA y VA en la leche de ovejas alimentadas con aceite de soja y linaza.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las ovejas Churras alimentadas con aceite de soja y linaza durante el inicio de lactación producen leche con mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados y CLA que cuando se incorpora aceite de palma hidrogenado o aceite de oliva. La mayor relación n6/n3 se produjo con el aceite de soja y la menor con el aceite de linaza. La utilización de aceites vegetales ofrece la posibilidad de modificar el perfil lipídico de la carne de lechazo sin afectar su crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Proyecto VA C2 C), la Junta de Castilla y León (Ref. VA058A07) y realizado dentro de un convenio de colaboración entre la Diputación de Palencia y la Universidad de Valladolid.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• Bouattour, M.A. 2007. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. • Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M. 2001. *Livest. Prod. Sci.* 70: 31-48. • Sanz Sampelayo, M.R., Ruiz Mariscal, I., Gil Extremera, F., Boza, J. 1997. *Anim. Sci.* 64: 485-492. • SAS. 2001. SAS Institute Inc., Cary, NC.

EFFECTS OF FEEDING VEGETABLE OILS TO LACTATING CHURRA EWES ON MILK COMPOSITION AND GROWTH OF SUCKING LAMBS

ABSTRACT. Forty eight Churra ewes were used to investigate the influence of four dietary vegetable oils (palm (PO), olive (OO), soybean oil (SO) and linseed oil (LO)) on milk composition and growth of sucking lambs. The percentage of SFA was higher ($P<0,001$) feeding PO. The proportion of MUFA was higher feeding OO and the proportion of PUFA and rumenic acid were higher ($P<0,001$) with SO and LO than PO and OO. Concentrations of n-3 fatty acids were higher ($P<0,001$) feeding LO. Growth of sucking lambs was not affected by treatments studied.

Keywords: vegetable oils, lactating ewes, sucking lambs, milk fatty acids

INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA COMPLETA SUPLEMENTADA CON DISTINTOS TIEMPOS DE PASTOREO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LECHE

Morales-Almaráz E., Vicente, F., González, A., Soldado, A., Martínez-Fernández, A. y de la Roza-Delgado, B.

Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Apdo. 13, E-33300 Villaviciosa (Asturias). fvicente@serida.org

INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado (ALC) ha demostrado tener efectos beneficiosos para la salud (Belury, 2002). Es un producto intermediario de la biohidrogenación ruminal (BH) del ácido linoleico (C18:2), además de ser sintetizado *de novo* en la glándula mamaria a partir del ácido vaccénico (C18:1t11) por acción de la Δ^9 desaturasa (Bauman *et al.*, 2006). Su concentración en leche está principalmente influenciada por la alimentación del ganado, por ello el aporte de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), como C18:2 y linolénico (C18:3), constituyen una alternativa para incrementar el nivel ALC. La base de la ración de primavera en vacuno lechero en la cornisa cantábrica es el ensilado de maíz, que constituye una fuente de C18:2 (Nielsen *et al.*, 2006) que aunado a la aportación de forraje fresco mediante el pastoreo, como fuente de C18:3 (Elgersma *et al.*, 2006), podría constituir una estrategia de alimentación para mejorar la calidad de la leche. El objetivo fue estudiar la influencia del tipo de forraje asociado al ensilado de maíz en la dieta completa (DC) complementada con pastoreo sobre la composición y perfil de AG en la leche de vaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos, cada uno con 15 vacas Holstein con producciones de $34,8 \pm 6,8$ y $38,1 \pm 2,0$ l/d, en el experimento 1 y 2, respectivamente, distribuidas en grupos homogéneos de cinco vacas, asignados al azar a tratamientos experimentales basados en la alimentación con DC formulada con ensilado de maíz asociado a ensilado de haba forrajera (EML; Exp.1) o heno de hierba (EMH; Exp.2), y complementada con 0, 6 ó 12 horas de pastoreo. Los tratamientos fueron: EML00, EML06, EML12, EMH00, EMH06 y EMH12. La DC (tabla 1) fue ofertada *ad libitum* durante el tiempo en que los animales permanecían en la estabulación y el pastoreo se realizó en praderas polifitas. Se realizaron dos ordeños diarios (07:30 y 19:30). Los animales EML12 y EMH12 pastaron entre ordeños, las vacas con tratamiento EML06 y EMH06 tenían acceso al pasto entre las 13:30 a 19:30, permaneciendo en la estabulación el resto del tiempo y los de EML00 y EMH00 permanecieron en estabulación continua. Se registró el consumo de DC y producción de leche. El valor nutritivo de los alimentos fue determinado por NIRS y el análisis de ácidos grasos (AG) según Sukhija y Palmquist (1988). En leche, la composición química fue determinada por MilkoScan FT6000 y la cuantificación de AG por cromatografía de gases-masas previa extracción de grasa (Feng *et al.*, 2004) y metilación de AG (Chouinard *et al.* (1999). Los datos se procesaron por análisis de varianza en un arreglo factorial 2^3 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El consumo de MS de DC fue un 42 y 24% mayor en los tratamientos EML00 y EMH00 que aquellos con 12h de pastoreo, no apreciándose diferencias entre dietas (tabla 2). La producción y composición de la leche no se vio afectada ($P > 0,05$) por los tratamientos. Ambas variables fueron mayores en los tratamientos con 6h de pastoreo (tabla 2), sin embargo, la producción de leche y proteína en leche fueron más altas con la dieta EMH que con EML ($37,6$ kg/d y $32,0$ g/kg vs. $35,4$ y $30,6$ g/kg, respectivamente). La grasa en leche disminuyó con el tiempo de pastoreo, y fue mayor cuando los animales consumieron EML

(37,7 g/kg) que EMH (33,1 g/kg). El contenido de C14:0 y C18:1t11 en leche fue mayor ($P<0,05$) en EML06 y EML12 que en los tratamientos EML00 y EMH00. Los tratamientos EML12 y EMH12 de pastoreo tuvieron menor contenido de C18:2, posiblemente por el menor consumo de este ácido con la DC y desaparición en el proceso BH, pero mostraron mayor concentración de AG insaturados (AGI) de cadena larga en la leche. El contenido de ALC y C18:3 en la leche aumentó linealmente ($P<0,05$) con el incremento del tiempo de pastoreo en ambas dietas duplicando su concentración con 12h de pastoreo. Estos resultados concuerdan con otros estudios (White *et al.* 2001; Dewhurst *et al.*, 2003) utilizando pastoreo observaron niveles similares de ALC en leche.

La calidad de la leche de vacas alimentadas con DC mejora cuando es complementada con 12 horas de pastoreo, disminuyendo la proporción de AG saturados (AGS), incrementando la de AGI, con mayor contenido de ALC. La inclusión de ensilado de haba forrajera en la dieta proporciona un perfil de ácidos grasos de la leche más saludable que cuando se incluye heno de hierba en raciones unifeed basadas en ensilado de maíz.

Tabla 1. Ingredientes y composición química de la dieta completa mezclada (DC) y pasto.

Ingredientes, (%MS)	Experimento 1		Experimento 2	
	EML	Pasto	EMH	Pasto
Ensilado de maíz	43,6		56,7	
Ensilado de haba forrajera	22,7		---	
Heno de hierba	---		12,2	
Paja de cereal	6,8		1,7	
Concentrados	26,9		29,4	
Composición Química				
Materia seca, %	48,3	15,0	61,0	15,0
MO	92,3	89,4	92,7	86,9
PB	14,8	19,8	13,6	21,5
FND	46,1	38,8	46,2	45,4
FAD	22,7	19,8	26,1	23,0
Almidón	17,3	-	19,7	-
ENI (Mcal/kg MS)	1,92	1,71	1,90	1,67
Ácidos grasos, % del total				
C16:0	41,6	23,7	33,2	22,5
C18:0	3,3	0,6	3,4	1,8
C18:1	28,0	2,4	31,6	2,8
C18:2	24,0	16,3	28,7	19,1
C18:3	1,5	55,8	2,4	52,2
Otros	1,6	1,2	0,7	1,6

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bauman DE., Mather IH., Wall RJ., Lock LA. 2006. J Dairy Sci. 89:1235-1243.
- Belury MA. 2002. Annu. Rev. Nutr. 22:505-531.
- Chouinard PY., Louise Corneau., Barbano DM., Metzger LE., Bauman DE. 1999. J Nutr. 129: 1579-1584.
- Dewhurst RJ., Shingfield KJ., Lee MR, Scollan ND. 2006. Anim Feed Sci Tech. 131:168-206.
- Elgersma A., Tamminga S., Ellen G. 2006. Anim Feed Sci Tech. 131: 207-225.
- Feng S., Lock AL., Garnsworthy PC. 2004. J Dairy Sci. 87: 3785-3788.
- Nielsen TS., Straarup EM., Vestergaard M., Sejrsen K. 2006. Repr. Nutr. Dev. 46: 699-712.
- Sukhija PS., Palmquist DL. 1988. J. Agric. Food Chem. 36: 1202-1206.
- White SL., Bertrand JA., Wade MR., Washburn SP., Green JR., Jenkins TC. 2001. J Dairy Sci. 84: 2295-2301.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos FICYT PC06-006 e INIA RTA2007-00058-C02. La estancia de E. Morales es financiada por CONACYT-México.

Tabla 2. Consumo de MS (kg/d), producción (kg/d), composición (g/kg) y perfil de ácidos grasos (g/100g AG) de la leche.

Ensilado (E) Pastoreo (P)	Experimento 1			Experimento 2			SEM	$P <^2$		
	EML 00	EML 06	EML 12	EMH 00	EMH 06	EMH 12		E	P	E*P
Consumo										
DC	19,6 ^a	15,1 ^b	11,3 ^c	17,5 ^a	17,7 ^a	13,2 ^{bc}	0,325	NS	*	*
Leche										
Producción	34,6	35,4	33,6	36,8	38,6	37,6	0,355	*	*	NS
Proteína	30,2	30,8	31,0	31,6	32,4	32,1	0,131	*	*	NS
Grasa	38,2	38,8	36,2	35,3	32,9	31,1	0,420	*	*	NS
Lactosa	50,8	49,8	50,1	47,0	47,1	46,8	0,163	*	NS	NS
Ácidos grasos										
C6:0	2,84	2,89	2,99	2,98	3,15	3,27	0,063	*	NS	NS
C8:0	0,89	1,01	1,02	1,71	1,71	0,83	0,054	*	NS	NS
C10:0	2,84	2,98	3,20	3,32	3,74	3,51	0,133	*	NS	NS
C12:0	2,32	2,44	2,57	3,43	3,84	3,58	0,188	*	NS	NS
C14:0	12,1 ^{ab}	12,2 ^{ab}	12,2 ^a	10,5 ^b	12,5 ^{ab}	10,8 ^{ab}	0,218	*	*	*
C14:1	0,40	0,30	0,41	0,67	0,58	0,82	0,067	*	NS	NS
C16:0	38,81	36,85	34,96	35,11	31,78	31,41	0,468	*	*	NS
C16:1	1,30	1,01	1,15	0,96	1,09	0,78	0,080	NS	NS	NS
C18:0	11,46	12,15	12,12	12,00	14,35	12,23	0,326	NS	*	NS
C18:1c9	21,63	21,26	22,92	22,83	20,31	23,71	0,415	NS	*	NS
C18:1f11	2,22 ^b	4,02 ^a	4,04 ^a	1,51 ^b	1,42 ^b	2,30 ^b	0,175	*	*	*
C18:2	2,19	1,74	1,75	2,63	2,42	2,10	0,066	*	*	NS
ALC	0,30	0,40	0,59	0,34	0,46	0,77	0,033	NS	*	NS
C18:3	0,18	0,34	0,51	0,12	0,20	0,37	0,024	*	*	NS
Otros	0,47 ^c	0,46 ^c	0,47 ^c	1,71 ^b	2,29 ^a	1,92 ^a	0,052	*	*	*
AGS	71,4 ^{ab}	70,6 ^{ab}	69,2 ^{ab}	70,8 ^{ab}	73,3 ^a	68,5 ^b	0,080	NS	*	*
AGI	28,5 ^{ab}	29,3 ^{ab}	30,7 ^a	29,2 ^{ab}	26,7 ^b	31,4 ^a	0,018	*	*	*

¹ Tratamientos basados en la fuente de ensilado en la DC: Ensilados de maíz-haba forrajera (EML) o ensilado de Maíz-Heno de hierba (EMH) complementados con el tiempo de pastoreo (0, 6 y 12 horas).

² Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

INFLUENCE OF TMR COMPOSITION COMPLEMENTED WITH DIFFERENT GRAZING TIMES ON MILK FATTY ACID PROFILE

ABSTRACT: The objective was to evaluate the influence of forage type included in a TMR based in maize silage and complemented with different grazing times in dairy cows as a strategy to improve milk fatty acids (FA) profile. Two experiments of three periods each one using thirty Holstein cows blocked and randomly assigned to one of six treatments in arrangement factorial design 2x3. Treatments applied were based in composition of TMR: silage type (maize-*Faba bean* silages (EML) and maize silage -hay grass (EMH), offered *ad libitum* indoor and complemented with grazing time: 12, 6 or 0 hours. Treatment EML00 (19.6 kg/d) had higher DMI of TMR and lower for EML12 (11.2 kg/d). Milk production and composition was unaffected by treatments. Vaccenic acid content was notably higher when dairy cows fed EML with six and twelve hours grazing. Increasing to 12 h grazing milk saturated FA concentration decreased and unsaturated FA increased especially conjugated linoleic acid and linolenic acid when feed EML compared with EMH.

Keywords: Grazing, maize silage, legume silage, fatty acid, conjugated linoleic acid (CLA).

IMPACTO DEL PASTOREO EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE EN GANADERIAS SEMINTENSIVAS

Vicente, F.¹, Rodríguez, M.L.², Morales-Almaráz, E., González, A. y de la Roza-Delgado, B.

¹Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Apdo. 13; E-33300 Villaviciosa (Asturias). fvicente@serida.org

²Sociedad Asturiana de Servicios Agropecuarios, S.L. (ASA). Sierra de Granda (Polígono Bravo) s/n. E-33199 Granda-Siero (Asturias).

INTRODUCCIÓN

La dieta es utilizada en la actualidad como un modo de ingestión de nutrientes con efectos favorables en la prevención y control de enfermedades. La ingestión de lípidos es relacionada tradicionalmente con el incremento en la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, lo que ha motivado su limitación en la dieta. Sin embargo, existen efectos positivos de la grasa de la leche sobre la salud humana, principalmente atribuidos al ácido linoleico conjugado (ALC) y a los ácidos omega-3. Su proporción puede ser modificada en función de la alimentación del ganado lechero, siendo la ingestión de forrajes de alta calidad el principal factor de influencia. La producción de leche en Asturias constituye un importante sector en la economía, y el uso óptimo de sus recursos forrajeros y pastables pueden contribuir a un mejor perfil de ácidos grasos de la leche y a un incremento en el valor añadido del producto final que redundaría en el productor. El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil de ácidos grasos de la leche producida en explotaciones ganaderas asturianas con el fin de establecer si existen diferencias según su sistema de explotación.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la primavera de 2008 se realizó un control de una selección de 20 explotaciones ganaderas asturianas, reuniendo 1100 vacas en lactación, lo que representa el 1,25% del censo de vacas lecheras de Asturias, y con una cuota láctea conjunta cercana a los 8 millones de litros. Las explotaciones fueron divididas en dos grupos, uno en estabulación permanente y otro con manejo mixto pastoreo-estabulación. Durante el periodo de seguimiento se realizó un muestreo semanal del alimento de cada explotación en el momento del reparto a lo largo del pesebre para determinar su valor nutritivo. En el mismo día se tomaron dos muestras de leche directamente del tanque, tras homogeneización, una de ellas con conservante para su análisis en macronutrientes por parte del Laboratorio Interprofesional Lácteo y Agroalimentario de Asturias (LILA) y una segunda sin conservante para determinar la concentración de ácidos grasos en el Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

Los contenidos de materia seca y cenizas de las muestras de alimentos se determinaron en estufa a 103 °C durante 24 h, seguida de la incineración en mufla a 550°C. Su valor nutritivo se estimó por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) y el fraccionamiento de la fibra mediante Van Soest *et al.* (1991). La composición en ácidos grasos (AG) de los alimentos se determinó mediante el método de Sukhija y Palmquist (1988) y en la leche por el método descrito por Chouinard *et al.* (1999) tras la extracción de la grasa según Feng *et al.* (2004). Los AG fueron cuantificados por cromatografía de gases-masas (Varian 4000 GC-MS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los componentes mayoritarios de la leche se muestran en la Tabla 1. La leche producida en explotaciones intensivas presentó un mayor contenido en grasa y en proteína. La menor proporción de grasa en las explotaciones con pastoreo es debida a la baja proporción de fibra efectiva de la hierba, a pesar del mayor contenido en FND de las dietas aportadas en estas explotaciones (46,51 vs. 43,44%). El mayor contenido en proteína en las explotaciones intensivas es reflejo del mayor contenido energético de la ración (1,25 vs. 1,21 Mcal ENI/kg MS). Ahora bien, en las explotaciones intensivas la proporción de urea en la

leche es significativamente superior a las explotaciones con un manejo mixto, lo que refleja una menor eficiencia en el uso de la proteína dietética suplementaria.

Tabla 1. Composición de la leche en explotaciones asturianas con diferentes manejos.

(g kg ⁻¹)	Intensivo	Mixto	e.e.	Significación
Grasa	35,8	34,6	0,15	***
Proteína	31,5	30,7	0,09	***
Lactosa	47,6	47,0	0,10	**
Extracto seco magro	86,5	84,9	0,36	*
Urea (mg kg ⁻¹)	295	264	5,1	**

El perfil de AG en la grasa de la leche según el tipo de manejo se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos en leche según el manejo de la alimentación.

Ácidos grasos (g/100g AG)	Intensivo	Mixto	e.e.	p
C6:0	3,02	2,97	0,025	NS
C8:0	1,66	1,61	0,017	*
C10:0	3,22	3,05	0,047	**
C11:0	0,12	0,11	0,006	NS
C12:0	3,49	3,36	0,052	*
C13:0	0,05	0,05	0,004	NS
Total cadena corta	11,57	11,13	0,092	**
C14:0	10,74	10,27	0,099	***
C14:1 c9	0,86	0,81	0,021	NS
C15:0	0,96	1,00	0,019	NS
C16:0	30,23	28,17	0,279	***
C16:1 c9	1,83	1,69	0,028	***
C17:0	0,80	0,93	0,030	**
C17:1 c10	0,13	0,16	0,007	*
Total cadena media	45,50	42,97	0,287	***
C18:0	13,38	13,90	0,116	**
C18:1 c9	24,42	25,17	0,207	*
C18:1 t9	ND	1,27	---	---
C18:1 t11	1,80	2,79	0,083	***
C18:2 c9c12	2,59	2,57	0,068	NS
C18:2 c9t11 ALC	0,47	0,91	0,038	***
C18:2 t9t12	0,07	0,08	0,004	*
C18:3 c6c9c12	0,01	0,01	0,001	NS
C18:3 c9c12c15	0,25	0,41	0,015	***
C20:0	0,06	0,06	0,004	NS
C20:2 c11c14	0,01	0,01	0,003	NS
C20:4 c5c8c11c14	0,08	0,07	0,010	NS
C21:0	0,003	0,003	0,002	NS
Total cadena larga	43,03	45,95	0,347	***
Saturados/ Insaturados	2,10	1,91	0,026	***
Omega-6/Omega-3	11,84	7,12	0,504	***

¹ Significación estadística entre manejo intensivo y mixto al nivel indicado; ND: No detectado.

Dentro del grupo de AG de cadena corta se observaron diferencias en las proporciones de los ácidos caprílico ($p < 0,05$), cáprico ($p < 0,01$) y laúrico ($p < 0,05$), los cuales se presentaron en menor proporción en las explotaciones con manejo mixto que contribuyen a la diferencia entre manejos de estos ácidos. El descenso en la proporción de AG de cadena media se debe fundamentalmente a un descenso en 2 puntos porcentuales en la concentración de

ácido palmítico ($p < 0,001$) en la leche producida en explotaciones con manejo mixto. Se observa asimismo, un descenso altamente significativo en la concentración de ácidos mirístico ($p < 0,001$) y palmitoleico ($p < 0,001$). Dentro de este grupo de ácidos grasos se observa un incremento en los C17, aunque su escasa proporción tiene poca influencia en el promedio de AG de cadena media en la leche de explotaciones de sistema de manejo mixto. El incremento en la proporción de AG de cadena larga en estas explotaciones mixtas se debe al aumento en las proporciones de los ácidos grasos C18. El consumo de hierba verde, cuyo principal AG es el linoléico, se traduce en un incremento significativo de este ácido en la leche así como de todos sus derivados hasta ácido esteárico. Así, se observan incrementos significativos en las proporciones de ácido esteárico (13,38 vs. 13,90; $p < 0,01$) y oleico (24,42 vs. 25,18; $p < 0,05$), detectándose además ácido eláidico que no está presente en la leche de las explotaciones intensivas. El contenido de ALC en la grasa de la leche se incrementó ($p < 0,001$) en el manejo mixto, duplicando la concentración de ALC en la grasa de la leche con respecto al manejo intensivo. Este aumento es debido al consumo y biohidrogenación de los ácidos linoleico y linoléico en la dieta. Asimismo, el manejo mixto afectó al contenido de ácido vacénico en la grasa de la leche ($p < 0,001$). Éste se incrementó en un 55% respecto a las explotaciones sin pastoreo (1,80 vs. 2,79). Los ácidos vacénico y ALC son un importante producto de la biohidrogenación de los ácidos linoleico y linoléico, mayoritarios en la hierba verde. El consumo de pasto conduce a una mayor respuesta en las concentraciones de vacénico y ALC en la grasa de la leche, debido a la mayor ingestión de ácido linoleico y linoléico en los animales. La proporción de ácidos grasos insaturados se incrementa ($p < 0,001$) paralelamente al descenso de ácidos saturados ($p < 0,001$), sobre todo debido al incremento en monoinsaturados como los ácidos oleico y vacénico. Los ácidos omega-3 se incrementan significativamente en las explotaciones con manejo mixto, mientras que los omega-6 no se ven afectados. Ahora bien, la relación de Omega-6/Omega-3 se sitúa en las explotaciones con pastoreo en 7,12 frente a 11,84 en las explotaciones sin pastoreo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Chouinard PY., Louise Corneau., Barbano DM., Metzger LE. & Bauman DE. 1999. *J Nutr.* 129: 1579-1584.
- Feng S., Lock AL. & Garnsworthy PC. 2004. *J Dairy Sci.* 87: 3785-3788.
- Sukhija PS. & Palmquist DL. 1988. *J. Agric. Food Chem.* 36: 1202-1206.
- Van Soest PJ., Robertson JB. & Lewis BA. 1991. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.

Agradecimientos: Proyecto FICYT PC06-006. Los estudios de doctorado de E. Morales-Almaráz son financiados por CONACYT-México. Los autores desean expresar su agradecimiento a las ganaderías participantes por su colaboración desinteresada.

IMPACT OF GRAZING ON MILK FATTY ACID PROFILE FROM SEMINTENSIVE DAIRY FARMS

ABSTRACT The aim of this work was to evaluate milk fatty acid (FA) profile produced in dairy farms from Asturias (North-West of Spain) to establish differences according to management systems. During spring 2008, 1100 lactating dairy cows from twenty farms were selected and divided in two homogeneous groups: one fed exclusively with TMR (indoor) and the other one fed mixed grazing-indoor. Feedstuffs and milk bulk tank were sampled weekly. We observe differences in milk composition with higher fat and protein content in indoor than mixed feeding system. Medium chain milk fatty acid content decrease due to diminution palmitic acid in mixed management, nevertheless this group showed higher concentration of long chain FA specially vaccenic acid, CLA and linolenic acid (2.79, 0.91 and 0.41 g/100gFA, respectively). When grazing is not included in feeding system the concentration of long chain FA is lower (1.80, 0.47 and 0.25 g/100gFA, for vaccenic, CLA and linolenic respectively). This effect could be influenced for pasture ingestion as source of polyunsaturated FA, improving the saturated/unsaturated FA and omega-6/omega-3 ratios.

Keywords: *Conjugated linoleic acid (CLA), management system, milk fatty acids*

EFFECTO DE TRANS-10, CIS-12 ACIDO LINOLEICO CONJUGADO SOBRE EL PORCENTAJE DE GRASA EN VACAS LECHERAS

Cegarra García E.¹, Hermida Ferro M.², Viana Ferreiro J.M.¹, Iglesias Becerra A.³

¹ Núter S.A.U. Av. Das Mariñas, 218 – 15176 Oleiros – La Coruña. España.

ecegarra@nuteriberia.com

²Laboratorio de Mouriscade. Diputación de Pontevedra Finca Mouriscade.Lalín-Pontevedra. España.

³Dpto. Anatomía y Producción Animal. Facultad de Veterinaria. USC. 27002. Lugo.

INTRODUCCION

El trans-10, cis-12 ácido linoleico conjugado (t-10,c-12 CLA) tiene una serie de efectos beneficiosos sobre la salud humana y sobre las producciones animales, entre ellas la de ser un potente depresor de grasa en la leche (Baumgard et al., 2000).

La depresión de grasa en la leche produce un importante ahorro de energía en el metabolismo de la vaca lechera, este efecto sirve para reducir las necesidades de energía en vacas en lactación y con ello producir una serie de mejoras en la producción, tales como incrementar la producción de leche, así como la producción de proteína, mejorar la reproducción al inicio de lactación, reducción de desórdenes metabólicos tras el parto y ayudar al manejo de la cuota lechera (Baumgard et al., 2001).

La utilización de CLA en la dieta de vacas lecheras es efectivo para producir depresión de grasa en leche (Lor and Herbein, 1998; Chouinard et al.1999 a, b; Giesy et al. 1999), siendo el t-10, c-12 CLA el isómero efectivo para la dicha depresión (Baumgard et al. 2000), también se ha visto este efecto en ovejas (Lock et al. 2006).

En este estudio, el objetivo es comprobar la eficacia de dos fuentes comerciales de t-10, c-12 CLA, como depresor de la grasa en leche en dos explotaciones de vacuno lechero en condiciones reales de explotación.

En una de ellas, se produjo una reducción significativa del porcentaje de grasa en la leche al cabo de 18 días de tratamiento (desde 3.66% a 3.45%), una vez cesado el tratamiento recuperaron el porcentaje de grasa del inicio de la prueba (3.63%).

En la otra explotación, durante el periodo en el que los animales recibieron el tratamiento, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de grasa de la leche, una vez que los animales cesaron el tratamiento tampoco se observaron diferencias significativas con respecto al porcentaje de grasa de la leche al inicio de la prueba.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron dos explotaciones ganaderas ubicadas en Galicia - España: Una con 79 vacas frisonas en ordeño, 170 días de lactación media, una producción de 31,9 litros por vaca y día y un contenido de grasa en la leche del 3.71%. La otra granja tiene 28 vacas frisonas en ordeño, 392 días de lactación media, una producción de 31 litros por vaca y día y un contenido de grasa de 3.51%.

La alimentación, en ambos casos, era una ración integral con ensilado de maíz, ensilado de hierba y concentrado que se homogeneizaron en un carro mezclador con un reparto de la comida de 2 veces al día. Las vacas se ordeñan 2 veces al día con un intervalo de 12 horas.

Se emplearon dos productos comerciales diferentes que contienen una fuente de CLA protegida ara evitar la hidrogenación ruminal. Esta fuente de CLA tiene la misma proporción de t-10, c-12 CLA y c-9, t-11 CLA en cantidad adecuada para proporcionar 4 gramos por vaca y día en la granja 1 y 5,35 gramos por vaca y día en la granja 2 de cada uno de los isómeros.

Una vez estabilizada la ración, se establecen 3 periodos de tratamiento para la realización de la prueba: Periodo A (sin Tratamiento), periodo B (con tratamiento) y periodo C (otra vez sin tratamiento).

En la granja 1, el periodo A dura 25 días, desde el 22 de febrero al 19 de marzo. El periodo B dura 30 días, desde el 21 de marzo al 21 de abril. El periodo C

dura 30 días, desde el 23 de abril al 23 de mayo. La adición del tratamiento se inicia el 3 de marzo y cesa el 14 de abril y se usaron 4 gramos por vaca y día durante 42 días.

En la granja 2, el periodo A dura 9 días, desde el 14 de abril al 23 de abril. El periodo B dura 21 días, desde el 25 de abril al 16 de mayo. El periodo C dura 7 días, desde el 19 de mayo al 26 de mayo. La adición del tratamiento se inicia el 25 de abril y cesa el 16 de mayo y se usaron 5.35 gramos por vaca y día durante 21 días.

Las muestras de la granja 1 se recogen cada vez que viene el camionero de recogida de la central lechera y en la granja 2 las muestras se recogen los lunes, miércoles y viernes. Todas las muestras son enviadas al laboratorio, en donde se obtienen los valores de las determinaciones de grasa (método Roese-Gottlieb, AOAC 17 th edition, Arlington, Virginia USA).

En cada ensayo los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y prueba estadística de Duncan para comparar sus medias ($P < 0.01$), utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la granja 1 existe una reducción significativa de 0.21 puntos en el porcentaje de grasa en leche al cabo de 18 días de tratamiento, ello representa una reducción del 5.73%. Una vez que se retira el t-10, c-12 CLA, se vuelven a los niveles de grasa anteriores a la prueba, tabla 1.

Tabla 1. Resumen de resultados de la grasa de la leche de granja 1

Granja 1	N	Media	Desviación
Periodo A (22 feb – 18 mar)	9	3.66 ^a	0.05
Periodo B (21 marzo – 21 abril)	9	3.45 ^b	0.06
Periodo C (23 abril – 23 mayo)	7	3.63 ^a	0.04

Dentro de cada periodo, los superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.01$) entre ellos.

En la granja 2 no existe una reducción significativa del porcentaje de grasa en leche durante los tres periodos estudiados, tabla 2.

Tabla 2. Resumen de resultados de la grasa de la leche de la granja 2

Granja 2	N	Media	Desviación
Periodo A (14 abril – 23 abril)	5	3.50 ^a	0.03
Periodo B (25 abril – 16 mayo)	10	3.52 ^a	0.05
Periodo C (19 mayo – 26 mayo)	4	3.50 ^a	0.04

Dentro de cada periodo, los superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.01$) entre ellos.

La bibliografía estudiada indica que el t-10, c-12 CLA es un potente depresor de la grasa en la leche en dosis comprendidas entre 3 y 10 gramos por vaca y día y con tiempos de respuesta al tratamiento de 4-5 días, una vez que cesa el tratamiento la recuperación de la grasa se produce al cabo de otros 4-5 días (Baumgard *et al.* 2000, Baumgard *et al.* 2001, Giesy *et al.* 2002, Viswanadha *et al.* 2003 entre otros).

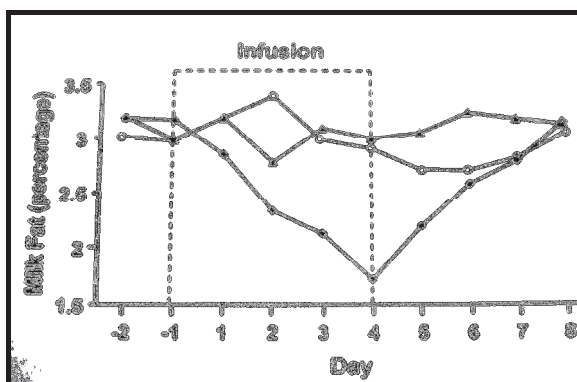


Figura 1: Suplementación de 10 gr./día de trans-10,cis-12 CLA y recuperación tras 4 días post-infusión. Tomado de Baumgard et al. 2000.

En las condiciones reales de explotación de las granjas estudiadas no se han visto los efectos descritos en la bibliografía, de tal modo que en la granja 1 se produce una depresión de grasa del 5.73% pasando de 3.66% a 3.45% con 18 días de tratamiento. En la granja 2 no se observan cambios significativos en el contenido de grasa en la leche a pesar de usar una dosis mayor y con 21 días de tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Baumgard L.H., B.A. Corl, D.A. Dwyer, A. Saebo, D.E. Bauman. 2000. Am. J. Physiol. Integrative Comp. Physiol. 278: R179-R184.
- Baumgard L.H., Sangster J.K., D.E. Bauman. 2001. J. Nutr. 131: 1764-1769.
- Baumgard, L.H., E. Matitashvili, B.A. Corl, D.A. Dwyer, D.E. Bauman. 2002. J. Dairy Sci. 85:2155-2163.
- Chouinard, P.Y., D.E. Bauman, B.A. Corl, L.H. Baumgard, M.A. McGuire, J.G. Giesy. 1999a. Porc. Cornell Nutr. Conf. Pp 93-101.
- Chouinard, P.Y., L. Corneau, D.M. Barbano, L.E. Metzger, D.E. Bauman. 1999. J. Nutr. 129: 1579-1584.
- Chouinard, P.Y., L. Courneau, W.R. Butler, Y. Chilliard, J.K. Drackley, D.E. Bauman. 2001. J. Dairy Sci. 84:680-690.
- De Veth M.J., J.M. Griinari, A.M. Pfeiffer, D.E. Bauman. 2004. Lipids 39:365-372.
- De Veth M.J., S.K. Gulati, N.D. Luchini, D.E. Bauman. 2005. J. Dairy Sci. 88:1685-1683.
- Griinari, J.M., B.A. Corl, S.H. Lacy, P.Y. Chouinard, K.V.V. Nurmela. 2000. J. Nutr. 130: 2285-2291.
- Giesy, J. G., M. A. McGuire, B. Shafii, T. W. Hanson. 2002. J. Dairy Sci. 85:2023-2029.
- Lock, A.L., B.M. Teles, J.W. Perfield II, D.E. Bauman, L.A. Sinclair. 2006. J. Dairy Sci. 89:1525-1532.
- Viswanadha, S., J.G. Giesy, T.W. Hanson, M.A. McGuire. 2003. J. Dairy Sci. 86:3229-3236.

EFFECT OF TRANS-10, CIS 12 CONJUGATED LINOLEIC ACID ON MILK FAT PERCENTAGE IN DAIRY COWS

ABSTRACT

Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (t-10, c-12 CLA) has positive effects on animal productions, one of them as depressor of milk fat (Baumgard *et al.*, 2000).

CLA is effective to produce depression of milk fat (Praise and Herbein, 1998; Chouinard *et al.* 1999a, b; Giesy *et al.* 1999), being t-10, c-12 CLA the effective isomer for this depression (Baumgard *et al.* 2000), also has been shown effective in sheep (Lock *et al.* 2006).

In this study, the aim is to verify the efficacy of two comercial sources of t-10, c-12 CLA, as depressor of milk fat in two farms in real conditions.

In one of them, was produced a significant depression on the percentage of milk fat after 18 days of treatment (from 3.66 % to 3.45 %), once stopped the treatment they recovered the percentage of fat produced at the beginning of the test (3.63 %).

In the other farm, during the period in which the animals received the treatment, significant differences were not observed on the percentage of milk fat, as soon as the animals finished the treatment, neither significant differences were observed on the percentage of milk fat produced at the beginning of the test.

Keywords: CLA, milk fat depression, cow

EFFECTO DE LA RELACIÓN FORRAJE:CONCENTRADO Y DEL TIPO DE FORRAJE DE LA DIETA SOBRE LAS POBLACIONES DE PROTOZOOS EN EL RUMEN DE OVEJAS Y EN FERMENTADORES RUSITEC

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido y M.D. Carro
Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León
memarp@unileon.es

INTRODUCCIÓN

El sistema de fermentadores Rusitec (Czerkawski y Breckenridge, 1977) es uno de los más utilizados en los estudios *in vitro* sobre la fermentación ruminal. Los protozoos constituyen una parte importante de la biomasa microbiana del rumen, y su caracterización, así como el estudio de su evolución en los fermentadores, resulta fundamental a la hora de extrapolar los resultados obtenidos a sistemas *in vivo*. Aunque diversos trabajos han analizado el efecto de diferentes factores de la dieta sobre las poblaciones protozoarias *in vivo* (Abe et al., 1981; Hristov et al., 2001) e *in vitro* (Abe y Kumeno, 1973; Carro et al., 1995) no existen hasta la fecha estudios que hayan comparado los resultados obtenidos en ovejas y en fermentadores Rusitec cuando ambos reciben las mismas dietas. En este trabajo se analizó el efecto de la relación forraje:concentrado y del tipo de forraje sobre las poblaciones de protozoos en el rumen de ovejas y en fermentadores Rusitec.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio *in vivo* se llevó a cabo utilizando cuatro ovejas fistuladas en el rumen, 16 fermentadores Rusitec y 4 dietas que consistieron en heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) y concentrado en proporción 70:30 (AL70 y GR70) y 30:70 (AL30 y GR30). Cada oveja recibió las 4 dietas en un diseño de cuadrado Latino 4 x 4 administradas a un nivel de 55 g/kg peso vivo^{0,75} para minimizar la selección. Tras 12 días de adaptación, se muestreó el fluido ruminal inmediatamente antes de la administración del alimento los días 13 y 14, y 5 ml de fluido ruminal se mezclaron con 5 ml de una solución fijadora (35% de formaldehído) para el posterior recuento de protozoos.

Para la prueba *in vitro* se dispuso de ocho ovejas fistuladas en el rumen. Dos ovejas recibieron cada una de las cuatro dietas. El día 1 se inocularon los 4 fermentadores de cada tratamiento con contenido ruminal (líquido y sólido) procedente de las dos ovejas que recibían la dieta correspondiente. Cada fermentador recibió diariamente 30 g de dieta administrados a las 9:00 h en el interior de dos bolsas de nailon (forraje y concentrado por separado). Los tiempos de retención fueron de 48 y 24 horas para el forraje y el concentrado, respectivamente, y el flujo de la fase líquida fue de 736,94 ml/día (tasa de dilución de 5,12%/h). Las muestras para el recuento de protozoos fueron tomadas del contenido del fermentador inmediatamente antes de la administración del alimento los días 13 y 14. Los protozoos se contaron por duplicado utilizando una cámara Hausser Nageotte Bright-Line (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) y se clasificaron en subfamilias según Dehority (1993). Cuando el coeficiente de variación fue mayor del 10% se repitió el recuento. Los resultados se analizaron independientemente para cada sistema de fermentación. En ambos casos, los factores analizados fueron la relación F:C, el tipo de forraje (FOR) y la interacción de ambos. El modelo utilizado para el análisis de los resultados *in vivo* incluyó la oveja como efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En concordancia con lo observado por Abe et al. (1972), no existió un efecto significativo sobre el número de protozoos pertenecientes a la familia Isotrichidae del tipo de forraje ($P=0,63$) ni de la relación F:C ($P=0,78$) en el rumen de las ovejas (Tabla 1), mientras que en los fermentadores esta familia desapareció al incubar dietas con un 70% de concentrado. Tanto en el rumen como en los fermentadores se observó un efecto ($P=0,003$ y $0,03$,

respectivamente) del tipo de forraje sobre los Entodiniinae, siendo más numerosos con las dietas que contenían AL en las ovejas y con las que contenían GR en los fermentadores. In vivo, la subfamilia Diplodiniinae presentó poblaciones mayores ($P<0,001$) en las dietas con un 70% de forraje, sin diferencias debidas al tipo de forraje ($P=0,55$), mientras que en los fermentadores esta subfamilia no se detectó cuando se administraron dietas con un 70% de concentrado. Ni la relación F:C ($P=0,10$) ni el tipo de forraje ($P=0,14$) afectaron a los Ophryoscolecinae en el rumen, mientras que en los fermentadores este grupo desapareció completamente, posiblemente debido a su elevado tiempo de regeneración (Dehority, 2004).

Tabla 1. Concentraciones de protozoos ($\times 10^3/\text{mL}$) en el fluido ruminal de ovejas y fermentadores Rusitec que recibían dietas con heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) y concentrado en proporciones de 70:30 (70) o 30:70 (30).

	Dieta				EEM ²	Efecto ($P =$) ¹		
	AL70	GR70	AL30	GR30		F:C	FOR	F:C x FOR
Ovejas								
Isotrichidae	48,5	48,1	50,7	58,2	12,17	0,63	0,78	0,75
Entodiniinae	1092 ^{bc}	676 ^a	1317 ^c	896 ^{ab}	101,2	0,06	0,003	0,98
Diplodiniinae	40,4 ^{ab}	19,4 ^a	71,2 ^{bc}	78,4 ^c	11,17	<0,001	0,55	0,24
Ophryoscolecinae	8,30	2,31	22,9	9,61	5,965	0,10	0,14	0,56
Total	1189 ^{bc}	746 ^a	1462 ^c	1042 ^b	113,9	0,03	0,004	0,92
Isotrichidae (%)	4,08 ^{ab}	6,45 ^b	3,46 ^a	5,59 ^{ab}	1,04	0,24	0,04	0,72
Entodiniinae (%)	91,7	90,6	90,1	85,9	2,02	0,22	0,15	0,61
Rusitec								
Isotrichidae	0,17 ^b	0,07 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	0,036	0,009	0,20	0,20
Entodiniinae	6,63 ^{ab}	8,82 ^b	3,11 ^a	7,96 ^{ab}	1,35	0,15	0,03	0,31
Diplodiniinae	0,17 ^c	0,07 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,20	<0,001	0,03	0,03
Ophryoscolecinae	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
Total	6,97 ^b	8,96 ^b	3,11 ^a	7,96 ^b	1,36	0,11	0,03	0,27
Isotrichidae (%)	2,44 ^b	0,78 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	0,54	0,008	0,16	0,16
Entodiniinae (%)	95,1 ^a	98,4 ^{bc}	100 ^c	100 ^c	0,53	<0,001	0,03	0,03

^{a, b, c} dentro de cada fila, los valores con diferente superíndice difieren ($P<0,05$).

¹ F:C: relación forraje:concentrado; FOR: tipo de forraje.

² error estándar de la media.

De acuerdo con resultados previos (Abe et al., 1981; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009), el número total de protozoos en el rumen fue mayor en las dietas con un 70% de concentrado ($P=0,03$), con valores superiores para AL que para GR ($P=0,004$). Por el contrario, el número de protozoos en los fermentadores fue mayor para las dietas que contenían GR ($P=0,03$) en comparación con las que contenían AL, y no se vio afectado por la relación F:C ($P=0,11$). La proporción de Isotrichidae en el rumen de las ovejas fue mayor con las dietas con GR que con las que contenían AL (valores medios de 3.77 y 6.02%, respectivamente). El porcentaje de Entodiniinae en las ovejas no fue afectado por ninguno de los dos factores, mientras que en los fermentadores ambos influyeron significativamente ($P<0,001$ y 0,03 para la relación F:C y tipo de forraje, respectivamente) alcanzando proporciones del 100% con las dietas con 70% de concentrado. En el rumen no existió ninguna interacción entre la relación F:C y el tipo de forraje, pero en los fermentadores se observaron interacciones para los Diplodiniinae ($P=0,03$) y el porcentaje de Entodiniinae ($P=0,03$).

Los resultados obtenidos indican que los fermentadores no reprodujeron los cambios en las poblaciones de protozoos observados in vivo cuando se administraron las diferentes dietas. Una posible causa de las diferencias observadas es el menor número de protozoos presente en los fermentadores, ya que los grupos con mayores tiempos de generación (Isotrichidae,

Diplodiniinae, Ophryoscolecinae) son arrastrados de forma selectiva fuera del sistema a medida que transcurren los días de incubación (Abe y Kumeno, 1973; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Carro et al., 1995). En el rumen, las poblaciones de protozoos se mantienen estables en el tiempo pese a las fluctuaciones diarias relacionadas con la administración de alimento y el ritmo de paso de la fase sólida y líquida (Abe et al., 1981). Algunos protozoos tienden a asociarse a la fracción fibrosa del alimento y a las zonas dañadas de las fibras vegetales. Esto podría explicar la ausencia de ciertos protozoos en los fermentadores que recibieron las dietas con 70% de concentrado.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL-2004-04755-CO2-01/GAN financiado por el M.E.C. M.E. Martínez disfruta de una beca F.P.U. del M.E.C. (AP2005-1797).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M., Kumeno, K. 1973. *J. Anim. Sci.* 36: 941-948.
- Abe, M., Shibui, H., Iriki, T., Kumeno, F. 1972. *Br. J. Nutr.* 29: 197-202.
- Abe, M., Iriki, T., Tobe, N., Shibui, H. 1981. *Appl. Environm. Microbiol.* 41: 758-765
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2009. *J Anim Sci* 2009.87:622-631.
- Carro, M.D., Lebzien, P., Rohr, K. 1995. *Small Rum. Res.* 15: 113-119.
- Czerkawski JW, Breckenridge, G. 1977. *Br. J. Nutr.* 38: 371-384.
- Dehority, B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of ruminal ciliate protozoa. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Dehority, B. A. 2004. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 333-338.
- Hristov, A.N., Ivan, M., Rode, L.M., McAllister, T.A. 2001. *J. Anim. Sci.* 79: 515-524.

EFFECT OF FORAGE:CONCENTRATE RATIO AND TYPE OF FORAGE ON PROTOZOA POPULATION IN SHEEP RUMEN AND RUSITEC FERMENTERS

ABSTRACT: The aim of this study was to study the effects of forage:concentrate (F:C) ratio and type of forage in the diet on protozoa populations in sheep rumen and Rusitec fermenters. The four experimental diets had F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage. Protozoa counting was done on two consecutive days after 12 days of feeding the diets. Neither F:C ratio ($P=0.63$) nor the type of forage ($P=0.78$) affected Isotrichidae numbers in sheep. Entodiniinae represented 91.2 and 88.0% of total protozoa for HF and HC diets, respectively. Diplodiniinae and total protozoa numbers were greater ($P<0.001$ and 0.03) for HC diets compared to HF ones, but Ophryoscolecinae numbers were not affected ($P>0.10$) by any of the dietary factors. Protozoa were maintained in all fermenters, but their numbers were between 83 (HFGR) and 470 (HCAL) times lower than those in sheep rumen. Isotrichidae and Diplodiniinae protozoa disappeared from the fermenters fed the HC diets, but they were present in low numbers ($0.07-0.17 \times 10^3/\text{mL}$) in the ones receiving the HF diets. Ophryoscolecinae protozoa were completely washed out of all fermenters, probably due to their long generation time. Entodiniinae represented 100% of all protozoa in the fermenters fed the HC diets, indicating that no other protozoa were able to survive. In the fermenters fed HF diets, Entodiniinae were 95.1 and 98.4% of total protozoa for AL and GR diets, respectively.

Keywords: *protozoa, forage:concentrate, sheep, Rusitec*

EVALUACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DE TRES MÉTODOS DE DESLIGAMIENTO DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA FASE SÓLIDA DE LA DIGESTA RUMINAL EN FERMENTADORES RUSITEC

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido, C. Saro y M.D. Carro
Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León.

memarp@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La estimación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen requiere el uso de marcadores y el aislamiento de pellets microbianos representativos de las poblaciones ruminales. El aislamiento de las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) es complicado, ya que se necesita desligar las bacterias de las partículas de digesta y recuperar la mayor proporción posible de las que han sido desligadas. Existen varios estudios que han analizado la eficacia de diferentes tratamientos físico-químicos y mecánicos para desligar las BAS de la digesta (Whitehouse et al., 1994; Martín-Orúe et al., 1998; Ranilla y Carro, 2003), pero en ellos no se ha determinado la representatividad de los pellets obtenidos. Por ello, en este trabajo se determinó la eficacia de tres procedimientos de desligamiento (PD) y se comparó el perfil de las comunidades microbianas de los pellets con el de la digesta original.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando cuatro fermentadores tipo Rusitec que recibieron una dieta compuesta por heno de alfalfa (HA) y concentrado (CON) en proporción 30:70 (en materia seca; MS). El contenido en materia orgánica, proteína bruta y fibra neutro detergente de la dieta fue de 913, 173 y 376 g/kg MS respectivamente. El día 1 del experimento se inocularon los fermentadores con contenido ruminal procedente de 4 ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con la misma dieta. Cada fermentador recibió diariamente 9 g de HA y 21 g de CON, suministrados en dos bolsas de nailon que permanecieron dentro de los fermentadores durante 48 horas. Como marcador microbiano se infundió $^{15}\text{NHCl}$ de forma continua. Los días 12, 13 y 14, tras la retirada de las bolsas de los fermentadores, se mezclaron los contenidos de las bolsas con el mismo sustrato y se tomó una muestra para analizar N no amoniacal (NAN) y ^{15}N . El resto del material se sometió a tres métodos de desligamiento: 1) MET: el residuo se resuspensión en metilcelulosa al 0,1% en solución salina (0,9% NaCl), incubación 15 min en agitación a 39°C y mantenimiento a 4°C durante 24 h (Ranilla y Carro, 2003); 2) STO: suspensión en solución salina, tratado en el Stomacher durante 5 minutos a velocidad media y mantenimiento a 4°C durante 24 h; y 3) CSTO: congelación inmediata a -20°C durante 72 horas, descongelación a 4°C durante 24 h y tratamiento STO. En todos los tratamientos, pasadas 24 horas, el residuo se procesó para obtener un pellet bacteriano de BAS por centrifugación diferencial (Ranilla y Carro, 2003) en el que se determinó su contenido en MS, NNA y ^{15}N . El porcentaje de BAS desligadas se calculó como la pérdida de átomos de ^{15}N en exceso en la digesta sólida tras el tratamiento de desligamiento correspondiente. La proporción de BAS recuperadas de las desligadas se calculó a partir de los enriquecimientos en ^{15}N de la digesta antes y después del tratamiento de desligamiento y los de los pellets bacterianos. El porcentaje de recuperación total se calculó como: $((\% \text{ BAS recuperadas de las desligadas}) \times (\% \text{ desligamiento})) / 100$.

Los perfiles de las comunidades bacterianas de las digestas y los pellets se analizaron mediante SSCP (Polimorfismo conformacional de cadena simple). Tras la extracción del ADN de las muestras, éste se amplificó utilizando cebadores específicos del gen 16S rRNA (Hori et al., 2006), se purificó y se obtuvieron amplicones de cadena simple mediante digestión enzimática con λ -exonucleasa. La separación de los fragmentos de ADN de cadena simple se llevó a cabo en un gel de MDE al 0,625% en 1x TBE buffer durante 20 h a 20°C y 20 mA, utilizando un DCode System (Biorad, EEUU). La tinción del gel se realizó con

un kit de tinción de plata (Amersham Biosciences, Suecia). La imagen del gel se obtuvo mediante escáner y el patrón de bandas se analizó con el programa Quantity One® (BioRad, EEUU). Para la comparación de los perfiles de las comunidades microbianas en los pellets y en la digesta se utilizó como criterio la ausencia o presencia de bandas en los pellets en relación a las existentes en la digesta correspondiente, y el resultado se expresó como porcentaje de similitud. Los resultados obtenidos se analizaron según medidas repetidas en el tiempo. Los efectos del PD, sustrato, y la interacción PD x sustrato se consideraron fijos, y el día se consideró un efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, no observaron interacciones PD x sustrato significativas ($P=0,66$ a $0,96$) en ninguno de los parámetros analizados. Para los dos sustratos, STO produjo un porcentaje de desligamiento mayor ($P<0,05$) que MET, y CSTO produjo valores intermedios. Los valores de desligamiento obtenidos para HA fueron superiores ($P=0,04$) a los observados para CON, lo que podría indicar que las bacterias adheridas a las partículas de concentrado presentaron una mayor resistencia al desligamiento. El porcentaje de recuperación de las BAS desligadas fue superior al 90% y no se detectaron diferencias entre sustratos ($P=0,87$) ni PD ($P=0,84$). Estos valores son mayores que los obtenidos previamente por nuestro grupo tras aplicar diferentes PD a digesta procedente de fermentadores Rusitec (Ranilla y Carro, 2003), e indicarían una menor pérdida de bacterias en el proceso de centrifugación y asilamiento de los pellets. El tratamiento STO fue el método que resultó en la recuperación total de BAS más alta, con valores del 65,7 y 50,8% para HA y CON, respectivamente, si bien las diferencias con CSTO no fueron estadísticamente significativas ($P>0,05$). El tratamiento MET produjo valores de recuperación total menores del 60% para HA y de 45% para CON. Sin embargo, el porcentaje de similitud de las comunidades microbianas de los pellets MET con la digesta correspondiente fue mayor que el obtenido con STO, alcanzando valores superiores al 83% para los dos sustratos.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento de la digesta con STO fue el método más eficaz para desligar BAS, pero los porcentajes de similitud obtenidos señalan que MET fue el método que produjo un pellet más representativo. Estos resultados indicarían que el porcentaje de desligamiento y recuperación no deben ser utilizados como el único criterio para evaluar los procedimientos de desligamiento de las BAS. Aunque la eficacia de desligamiento de MET fue 8,7 y 14,4% menor que la del STO para HA y CON, respectivamente, los mayores porcentajes de similitud para la MET indicarían que puede ser considerado actualmente el método de elección para tratar la digesta en fermentadores Rusitec.

Tabla 1. Porcentajes (%) de desligamiento, recuperación y recuperación total de bacterias asociadas a la fase sólida de la digesta (BAS) desligadas de heno de alfalfa (HA) y concentrado (CON) incubados en fermentadores Rusitec tras aplicar tres procedimientos de desligamiento (PD), y porcentaje de similitud entre los perfiles de las comunidades microbianas en la digesta y en los pellets.

Item	Sustrato	PD ¹			EEM ²	Nivel de significación		
		MET	STO	CSTO		Sustrato	PD	Sustrato x PD
Desligamiento	HA	65,3 ^a	71,5 ^b	68,6 ^{ab}	1,46	0,04	0,004	0,77
	CON	48,6 ^a	56,8 ^b	53,4 ^{ab}				
Recuperación	HA	90,3	92,0	90,0	2,94	0,87	0,84	0,82
	CON	92,0	90,0	89,0				
Recuperación total	HA	58,9 ^a	65,7 ^b	61,6 ^{ab}	1,56	0,03	0,01	0,96
	CON	44,8 ^a	50,8 ^b	47,6 ^{ab}				
Porcentaje de similitud	HA	84,0 ^b	77,1 ^{ab}	72,5 ^a	2,80	0,91	0,02	0,66
	CON	86,4 ^b	82,4 ^b	67,8 ^a				

^{a, b} dentro de cada fila, los valores con diferente superíndice difieren (P<0,05).

¹ ver texto para la descripción de los tratamientos.

² error estándar de la media.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL-2004-04755-CO2-01/GAN financiado por el M.E.C. M.E. Martínez disfruta de una beca F.P.U. del M.E.C. (AP2005-1797).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. & Igarashi, Y. 2006. *J. Microbiol. Methods*. 66: 165-169.
- Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Zakraoui, F. & Castrillo, C. 1998. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 269-282.
- Ranilla, M.J. & Carro, M.D. 2003. *J. Anim. Sci.* 81: 537-544.
- Whitehouse, N.L., Olson, V.M., Schwab, C.G., Chesbro, W.R., Cunningham, K.D. y Lykos, T. 1994. *J. Anim. Sci.* 72: 1335-1343.

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE EVALUATION OF THREE PROCEDURES FOR DETACHING SOLID-ASSOCIATED BACTERIA FROM RUMINAL DIGESTA IN RUSITEC FERMENTERS

ABSTRACT: Three detachment procedures (DP) were evaluated for their ability to remove solid-associated bacteria (SAB) from alfalfa hay (AH) and concentrate (CON) digesta in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet. ¹⁵NH₄Cl was used to label bacterial biomass, and PCR-SSCP analysis of the 16S ribosomal DNA was used to analyze the similarity between bacterial communities attached to the substrate and those in the pellet obtained after each DP. Treatments were: 1) MET: digesta was incubated with saline solution containing 0.1% methylcellulose (38°C, 15 min); 2) STO: residues were mixed with cold saline solution and homogenised with a stomacher (230 rev/min, 5 min); 3) CSTO: residues were immediately frozen (-20°C, 72 h), thawed (4°C, 24 h), and treated as in STO procedure. Common to all treatments was storing at 4°C for 24 h after the treatment and homogenization before isolation of SAB. Although STO was the most effective method to detach ruminal microbes from both AH (71.5%) and CON (56.8%), MET produced pellets with greater similarity to the bacterial communities attached to the substrates (84.0 and 86.4% for AH and CON, respectively) and therefore could be considered the most appropriate DP method for treating digesta from Rusitec fermenters.

Keywords: detachment, ¹⁵N, ruminal microbes, PCR-SSCP

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD INDIVIDUAL EN LAS CONCENTRACIONES DE DISTINTAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL RUMEN DE CAPRINO

Yáñez-Ruiz D.R.¹, Soto E.C.¹, Newbold C.J.², Molina-Alcaide E.¹

¹ Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España. Email: david.yanez@eez.csic.es.

² Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences (IBERS), Aberystwyth University, Llanbadarn Campus, SY23 3AL, Aberystwyth, Reino Unido.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de técnicas de biología molecular como la PCR a tiempo real (qPCR) está permitiendo la cuantificación, con gran precisión, de comunidades microbianas del rumen (bacterias, protozoos o arqueas metanogénicas), y de especies de interés por su implicación en distintos procesos metabólicos. Algunos resultados publicados recientemente en este campo apuntan una elevada variabilidad en las concentraciones de distintos grupos microbianos ruminales entre animales y, dentro de un mismo animal, a lo largo del día (Swain et al., 1996; Belenguer et al., 2009) o entre días de muestreo. Esto representa una dificultad para diseñar la pauta de muestreo, el análisis estadístico y la interpretación de los resultados en estudios que relacionen las comunidades microbianas presentes en el rumen y el comportamiento digestivo del animal.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la variación entre animales de un mismo rebaño alimentados con una dieta estándar en cuanto a la evolución diaria en la concentración ruminal de los grupos microbianos mayoritarios y de dos especies de bacterias implicadas en la degradación de fibra (*Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*).

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento consistió en 3 períodos, cada uno de los cuales se llevó a cabo con 3 cabras de raza granadina adultas ($54,2 \pm 7,65$ kg peso vivo), secas y canuladas en rumen. Los animales se alimentaron durante 1 mes a nivel de mantenimiento energético con heno de alfalfa de buena calidad, servido dos veces al día antes del inicio del primer periodo experimental. Los animales se mantuvieron dentro del establo, en cubículos individuales y sin contacto entre ellos. En el período I se recogieron muestras (100 g) de contenido ruminal de cada animal a las 0, 2 y 4 horas tras el suministro de alimento de la mañana durante dos días (d1 y d2) con una semana de diferencia entre ambos. Las muestras se pesaron y fueron inmediatamente congeladas, liofilizadas y conservadas a -20°C hasta la extracción de ADN. Al comienzo del período II, se obtuvo 1 litro de contenido ruminal de cada uno de los animales en un termo precalentado a 39°C antes del primer suministro de alimento. A continuación, se transfirió el del animal 1 al 2, el del 2 al 3 y el del 3 al 1. Dos (d3) y quince días (d4) después se recogió contenido ruminal de cada animal a las mismas horas y siguiendo el mismo proceso descrito en el período I. En el período III se transfirió 1 litro del contenido ruminal del animal 1 al 3, del 3 al 2 y del 2 al 1 procediéndose de igual manera que en el período II. Tras la liofilización, las muestras se sometieron a agitación mecánica (Mini Bead Beater™) y el ADN se extrajo con el kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, UK). En los extractos de ADN se cuantificó, mediante qPCR (iCycler, IQ5, BioRad) y empleando sondas específicas, la concentración de bacterias totales (Maeda et al., 2003), protozoos totales (Sylvester et al., 2005), arqueas metanogénicas totales (Denman et al., 2007), *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* (Denman y McSweeney, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los animales mantuvieron un nivel de ingesta y peso constantes. La evolución de la concentración de los distintos grupos microbianos durante el período I no respondía a un patrón definido, lo que puede deberse a diversos factores: el análisis se realizó con

contenido ruminal completo y no líquido, la dieta estaba constituida solo por forraje y suministrada a nivel de mantenimiento y, sólo se recogieron muestras hasta 4 horas después del suministro del alimento. Los coeficientes de variación (CV) de las concentraciones de los distintos grupos microbianos (Tabla 1) durante el Periodo I y a las 0 horas eran, generalmente, superiores a los obtenidos a las 2 y 4 horas tras el suministro de alimento. Ello sugiere que las muestras recogidas antes de la ingestión de alimento reflejan la biomasa microbiana propia de cada animal y que, la variabilidad animal se diluye por efecto de la ingestión del alimento (Dehority, 2003). En el Periodo I, los grupos microbianos mayoritarios analizados mostraron una variación media entre animales del 20 % (1-32 en bacterias, 7-58 en protozoos y 5-28 en arqueas metanogénicas). La variabilidad entre animales de las concentraciones de *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* resultó notablemente superior (66-172 y 46-62 %, respectivamente).

La variabilidad en un mismo animal (datos no mostrados) era similar a observada entre animales para las poblaciones mayoritarias pero muy inferior para las especies bacterianas estudiadas (Swain et al., 1996). Sin embargo, cada animal parece albergar concentraciones muy distintas de algunas especies, como muestra la Figura 1, en la que se puede observar que en el Periodo I, tanto en el día 1 como en el 2, existe un patrón fijo de concentraciones de *R. flavefaciens* (animal 1>2>3). En los períodos II y III, en los que se realizó un trasvase de contenido ruminal, la variación entre animales de las concentraciones de *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* disminuyó notablemente a niveles similares observados en los grupos mayoritarios, especialmente en el muestreo del día 1.

Nuestros resultados muestran que las concentraciones ruminales de los grupos mayoritarios de microorganismos en animales de un mismo rebaño, alimentados con forraje a nivel de mantenimiento, son muy similares. Sin embargo, existe una alta variabilidad individual en determinadas especies bacterianas, que podría explicar diferencias individuales en la capacidad o respuesta digestiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer A., Hervás G., Doce R.R., Yáñez-Ruiz D.R., Santos N., Mantecón A.R. & Frutos P. 2009. *XII Jornadas sobre producción Animal, AIDA* ● Dehority B.A. 2003. Nottingham University Press ● Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS. 2007. *FEMS Microbiol Ecol.* 62: 313-22. ● Denman SE, McSweeney CS. 2006. *FEMS Microbiol Ecol.* 58: 572-82. ● Maeda H., Koikeguchi S., Arai, H., Tanimoto I., Nishimura, F. & Takashiba S. 2003 *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 39: 81-86. ● Swain RA, Nolan JV & Klieve AV. 1996. *Appl Environmental Microbiol.* 62: 994-997 ● Sylvester JT, Karnati SK, Yu Z, Newbold CJ & Firkins JL. 2005. *J Dairy Sci.* 88: 2083-2095.

Tabla 1. Coeficientes de variación (%) medios de las concentraciones (n° copias gen/g materia fresca) de bacterias (BT), protozoos (PT) y metanogénicas (MET) totales, *R. flavefaciens* (Rf) y *F. succinogenes* (Fs) en el contenido ruminal de caprino alimentado con heno de alfalfa.

		BT	PT	MET	Rf	Fs	
Periodo I	d1	0 h	33,2	35,8	27,8	172	62,8
		2 h	11,5	7,21	6,55	105	59,5
		4 h	18,6	57,9	16,2	90,0	45,4
	d2	0 h	31,7	25,3	15,3	93,5	52,2
		2 h	1,60	15,8	18,3	66,0	43,5
		4 h	24,6	19,2	5,0	99,5	46,3
Periodo II	d3	2 h	2,52	19,5	13,6	34,2	11,3
	d4	2 h	32,8	30,0	40,4	51,3	30,1
Periodo III	d5	2 h	36,0	48,5	13,3	41,5	12,4
	d6	2 h	8,44	15,2	45,9	63,3	57,2

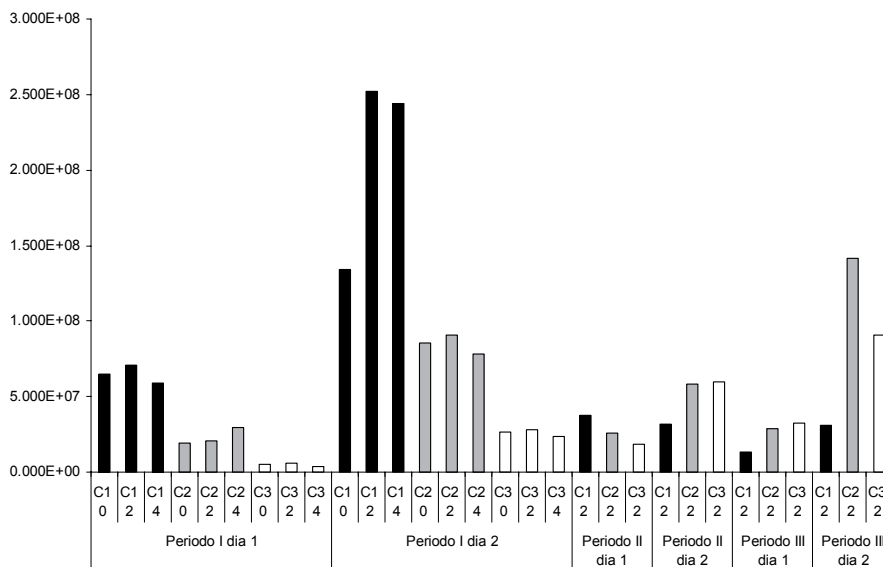


Figura 1. Concentración de *Ruminococcus flavefaciens* (copias gen 16s/g MF) en el contenido ruminal de caprino alimentado con heno de alfalfa (Cabra 1: C1; Cabra 2: C2; Cabra 3: C3) a las 0, 2 y 4 horas tras la administración del alimento.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del programa Marie Curie de la Comisión Europea (ERG-224816-METANORUMEN).

STUDY OF THE ANIMAL VARIABILITY ON THE NUMBERS OF DIFFERENT MICROBIAL GROUPS IN THE GOATS' RUMEN

ABSTRACT. The use of classical culture and, more recently, modern molecular techniques such as real-time PCR to quantify microbial groups in the rumen show a high animal to animal variability and, sometimes, a contradictory diurnal variation pattern. This work aimed to study the animal variation in the numbers of some microbial groups in the rumen within an established flock. In a first period (I), three adult goats cannulated in the rumen were fed alfalfa hay and samples of rumen contents collected at 0, 2 and 4 hours after the morning feeding in two non consecutive days. In two following periods (II and III) rumen contents was transferred between animals to evaluate the consistency of the differences between animals observed in Period I. The concentration of total bacteria, methanogenic archaea, protozoa, *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens* were determined by real time PCR. The animal to animal variability was higher before than after the morning feeding and lower with regards to bacteria, protozoa and archaea than to *F succinogenes* and *R flavefaciens*. The high variability in these two bacterial species was reduced after the rumen contents were exchanged between animals.

Keywords: animal variability, alfalfa hay, molecular techniques, rumen, qPCR.

EFFECTOS DE CAMBIOS EN LA DIETA Y LA ADICIÓN DE LEVADURAS SOBRE LA FERMENTACIÓN MICROBIANA RUMINAL DE TERNERAS

Moya, D., Calsamiglia, S., Ferret, A., Fandiño, J.I., Castillejos, L. y Yoon, I.
Fac. de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, 08193.
sergio.calsamiglia@uab.es

INTRODUCCIÓN

Con un incremento brusco de los carbohidratos no fibrosos en la ración, se favorecen las poblaciones bacterianas amilolíticas y productoras de láctico (como *Streptococcus bovis*) en detrimento de las consumidoras de láctico (como *Megasphaera elsdenii*), con la consecuente acumulación de ácidos en el rumen y la aparición de acidosis (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). Además, también aumenta la viscosidad del líquido ruminal y, por tanto, el riesgo de desarrollar timpanismo (Cheng et al., 1998). Estudios previos muestran que la aparición de un trastorno digestivo depende, entre otros, de factores individuales. Sin embargo, no se han analizado qué parámetros pueden ayudar a predecir la aparición de acidosis y/o timpanismo en un mismo estudio. Por otro lado, la adición de cultivo de levaduras podría estabilizar la fermentación ruminal, previniendo trastornos digestivos o facilitando su recuperación, al estimular específicamente bacterias fibrolíticas y consumidoras de láctico como *M. elsdenii* (Callaway y Martin, 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 terneras Holstein (277 ± 28 kg PV) con cánula ruminal en un diseño de crossover de 2 periodos de 5 semanas. En cada periodo, tras 3 semanas de adaptación con una dieta 100% forrajera, la inducción del trastorno digestivo empezó aumentando la cantidad de concentrado 2,5 kg MF/d durante un periodo de 4 días, hasta alcanzar una proporción 10:90 de forraje:concentrado, para luego mantenerla durante 10 días. La ración se ofrecía diariamente a las 0900 h y se retiraba a las 2100 h para forzar un consumo más rápido a la mañana siguiente tras 12 horas de ayuno. Entre periodos los animales se alimentaron otra vez con la dieta 100% forrajera sin ningún tratamiento. El concentrado fue formulado para alcanzar o exceder los requerimientos de energía y PB de terneros de engorde (NRC, 1996), aunque la proporción de carbohidratos no fibrosos fue intencionadamente alta (54,3%). Los tratamientos empezaron el primer día de cada periodo, y fueron una dieta control (CT) o la misma dieta con la adición del cultivo de levaduras (LV, Diamond V XPCLS™). La aparición de trastornos digestivos se determinó mediante la observación visual de timpanismo (Paisley y Horn, 1998) o por una reducción de la ingesta del 50% o más respecto al día anterior. Siguiendo las instrucciones del Comité de Bienestar Animal, cuando se detectaba un caso de trastorno digestivo, el animal afectado se cambiaba a la dieta 100% forrajera sin ningún tratamiento para procurar su recuperación. Durante la inducción del trastorno digestivo, se determinó la ingesta diariamente a las 2, 6 y 12 h post alimentación, y se tomaron muestras de líquido ruminal cada día para determinar el pH ruminal a las 0, 3, 6 y 12 h post alimentación, y los AGV totales e individuales, ácido láctico, N amoniacal, viscosidad del líquido ruminal y cuantificar las poblaciones de *Streptococcus bovis* y *Megasphaera elsdenii* mediante PCR cuantitativa a las 0 y 6 h post alimentación. También se determinó la espumosis y la resistencia de la espuma del líquido ruminal el día después de la aparición del trastorno digestivo para evaluar el poder espumante del líquido ruminal. Para reducir el volumen de muestras a analizar, se tomó el día en que aparecía el trastorno digestivo como referencia y se analizaron los tres días anteriores, el día del trastorno, y 1, 2 y 5 días posteriores. En cuanto a las muestras de PCR, sólo se analizaron las correspondientes a 3 días anterior y al día del trastorno digestivo. Los datos se analizaron como un split-split plot usando el procedimiento MIXED de SAS para medidas repetidas, incluyendo el periodo, la secuencia, el día, la hora y el tratamiento en el modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron efectos ($P > 0,10$) del periodo o la secuencia, ni interacciones entre el tiempo (horas o días) y el tratamiento, por lo que ambos efectos se discuten por separado.

Inducción del trastorno digestivo: El modelo propuesto logró causar un total de 20 casos (83,3%) de trastornos digestivos, todos detectados por una reducción del 50% o más en la

ingesta, por lo que no se observaron signos de timpanismo. Estos trastornos aparecieron de media a los $7,00 \pm 0,62$ d. Los días previos al trastorno digestivo, el pH ruminal descendía ($P < 0,01$) a las 12 h post alimentación, pero se recuperaba tras las 12 h de ayuno (Tabla 1). Sin embargo, el día del trastorno digestivo a las 0 h el pH no se había recuperado, siendo inferior al resto de los días ($P < 0,05$), y permaneciendo tras más de 18 h por debajo de 6,0. Posiblemente ésta fue la causa de la reducción en la ingesta. La concentración total de AGV fue superior ($P < 0,05$) el día del trastorno digestivo a las 0 h que el resto de días a la misma hora, lo que explicaría la falta de recuperación del pH previamente comentado. También encontramos un aumento ($P < 0,05$) en la concentración de ácido láctico el día del trastorno digestivo a las 0 y 6 h post alimentación comparado con el resto de días, probablemente también relacionado con el bajo pH encontrado el día del trastorno. Sin embargo, no todas las terneras afectadas mostraron este aumento de ácido láctico. Sólo en un 25% de los casos a las 0 h y un 10% a las 6 h post alimentación mostraron una concentración de láctico superior a 1,5 mM, lo que sugiere que su implicación en el desarrollo de un trastorno digestivo probablemente este sobrevalorado.

La población de *S. bovis* aumentó ($P < 0,05$) el día del trastorno digestivo comparado con 3 días anteriores a éste, coincidiendo con el aumento en la concentración total de AGV y de láctico (Tabla 1). Sin embargo, la población de *M. elsdenii* también tendió a aumentar ($P < 0,10$) el día del trastorno digestivo, aunque no se reflejó en una reducción de la concentración de láctico. Esto sugiere que quizás el papel de *M. elsdenii* como utilizador de láctico durante el desarrollo de un trastorno digestivo no sea determinante, aunque sería necesaria más investigación en este sentido.

La viscosidad del líquido ruminal fue mayor ($P < 0,05$) el día del trastorno digestivo a las 0 y 6 h respecto a 3 y 2 días anteriores y los días posteriores al trastorno, coincidiendo con el aumento de la población de *S. bovis*, tal y como mostró Cheng et al. (1976). Sin embargo, no pudimos confirmar si este aumento en la viscosidad acabaría desarrollando timpanismo ya que, siguiendo las instrucciones del Comité de Bienestar Animal, los animales cambiaban a una ración 100% forrajera al día siguiente de diagnosticarles el trastorno digestivo

Efectos del cultivo de levaduras durante la inducción del trastorno digestivo: La adición de LV no afectó ($P > 0,10$) al número de casos de trastornos digestivos (se registraron 10 casos por tratamiento), ni al tiempo en que éstos aparecían (7,00 d, EEM = 0,85).

Salvo alguna interacción puntual con la hora post ingestión (datos no mostrados), LV tampoco afectó ($P > 0,10$) la ingesta (7,27 kg, EEM = 0,39), el pH (6,27, EEM = 0,05), la concentración total de AGV (104,8 mM, EEM = 3,41), la concentración de láctico (2,03 mM, EEM = 0,83), las poblaciones de *S. bovis* (11,7 Log copias/mL, EEM = 0,32) o *M. elsdenii* (3,81 Log copias/mL, EEM = 1,08), ni la viscosidad del líquido ruminal (5,37 cP, EEM = 0,34).

Aunque la adición de LV no afectó ($P > 0,10$) la espumidad del líquido ruminal (17,2 cm, EEM = 1,88), sí redujo ($P < 0,05$) la resistencia de la espuma (CT = 32,3 min; LV = 12,1 min; EEM = 5,86). Aunque en este estudio no se encontraron síntomas de timpanismo, esta reducción de la espumidad sugiere efectos potenciales de LV en la reducción del riesgo de timpanismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Callaway, E. S., S. A. Martin. 1997. J. Dairy Sci. 80:2035-2044.
- Cheng, K. J., R. Hironaka, G. A. Jones, T. Nicas, J. W. Costerton. 1976. Can. J. Microbiol. 22:450-459.
- Cheng, K. J., T. A. McAllister, J. D. Popp, A. N. Hristov, Z. Mir, H. T. Shin. 1998. J. Anim. Sci. 76:299-308.
- Nagaraja, T. G., E. C. Titgemeyer. 2007. J. Dairy Sci. 90:17-38.
- NRC. 1996. 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Paisley, S. L., G. W. Horn. 1998. Oklahoma State Univ., Anim. Sci. Res. Rep.141-146.

Tabla 1. Efecto de la inducción del trastorno digestivo sobre la fermentación ruminal.

Variable	Día						
	-3 d	-2 d	-1 d	0 d	1 d	2 d	5 d
pH ruminal ¹							
Hora 0	6,67 ^{a,y}	6,54 ^{a,y}	6,47 ^{a,y}	5,95 ^{b,z}	7,01 ^{a,x}	7,01 ^{a,x}	7,02 ^{a,x}
Hora 3	6,10 ^{b,z}	6,12 ^{b,z}	6,09 ^{b,z}	6,24 ^{a,z}	6,48 ^{b,y}	6,68 ^{b,x}	6,45 ^{b,y}
Hora 6	5,93 ^{c,z}	5,86 ^{c,z}	5,76 ^{c,z}	6,33 ^{a,y}	6,40 ^{b,c,xy}	6,53 ^{c,x}	6,44 ^{b,xy}
Hora 12	5,62 ^{d,z}	5,61 ^{d,z}	5,47 ^{d,z}	6,06 ^{b,y}	6,30 ^{c,x}	6,28 ^{d,x}	6,20 ^{c,xy}
AGV totales, mM ²							
Hora 0	107,3 ^{b,x}	111,3 ^{b,x}	117,6 ^{b,wx}	125,0 ^{a,w}	76,3 ^{b,z}	75,9 ^{b,z}	89,6 ^{b,y}
Hora 6	127,4 ^{a,w}	130,8 ^{a,w}	131,3 ^{a,w}	94,3 ^{b,xy}	91,6 ^{a,xy}	87,6 ^{a,y}	100,2 ^{a,x}
Láctico, mM ³							
Hora 0	0,99 ^x	1,01 ^x	1,21 ^x	10,3 ^{a,w}	1,06 ^x	0,89 ^x	0,96 ^x
Hora 6	1,07 ^x	1,20 ^x	1,19 ^x	5,34 ^{b,w}	1,16 ^x	1,10 ^x	1,03 ^x
<i>S. bovis</i> ⁴	11,5 ^x	-	-	11,9 ^w	-	-	-
<i>M. elsdenii</i> ⁵	2,88	-	-	4,74	-	-	-
Viscosidad, cP ⁶							
Hora 0	7,29 ^{a,x}	7,95 ^{a,x}	8,53 ^{a,wx}	10,3 ^{a,w}	6,56 ^{a,x}	4,11 ^{a,xy}	3,84 ^{a,y}
Hora 6	3,90 ^{b,xy}	4,49 ^{b,x}	4,79 ^{b,x}	6,61 ^{b,w}	2,66 ^{b,yz}	2,12 ^{b,z}	1,99 ^{b,z}

¹ Efecto hora, $P < 0,01$; día, $P < 0,01$; e interacción hora por día, $P < 0,01$. EEM = 0,084.

² Efecto hora, $P < 0,01$; día, $P < 0,01$; e interacción hora por día, $P < 0,01$. EEM = 4,80.

³ Efecto hora, $P = 0,15$; día, $P = 0,01$; e interacción hora por día, $P < 0,01$. EEM = 1,60.

⁴ Efecto hora, $P = 0,47$; día, $P = 0,048$; e interacción hora por día, $P = 0,54$. EEM = 0,28.

⁵ Efecto hora, $P = 0,4$; día, $P = 0,06$; e interacción hora por día, $P = 0,56$. EEM = 0,97.

⁶ Efecto hora, $P = 0,09$; día, $P = 0,37$; e interacción hora por día, $P = 0,07$. EEM = 0,64.

^{a, b, c, d} Medias por variable con diferente superíndice en la misma columna son diferentes ($P < 0,05$).

^{w, x, y, z} Medias por variable con diferente superíndice en la misma fila son diferentes ($P < 0,05$).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por Diamond V Mills, Inc.

EFFECTS OF DIETARY CHANGES AND YEAST CULTURE ON RUMEN MICROBIAL FERMENTATION OF HEIFERS

ABSTRACT: Twelve heifers with ruminal cannula were used in a crossover design with 2 periods of 5 weeks: 3 weeks with a 100% forage diet and 2 weeks with a 10:90 forage to concentrate diet. Treatments were a control diet (CL) or the same diet with yeast culture (YC, Diamond V XPC_{LS}TM). Digestive upsets were determined by a reduction in feed intake of 50% or more. Feed intake was determined daily at 2, 6, and 12h post-feeding. Ruminal liquid samples were collected daily at 0 and 6h post-feeding to determine ruminal pH, total and individual VFA, lactic acid, ammonia-N and rumen fluid viscosity. *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* were quantified by qPCR. Foam height and strength were determined the day after the digestive upset. A total of 20 cases (83.3%) of digestive upsets were recorded in both periods. Rumen fermentation profile on the digestive upset day was characterized by low ruminal pH and high total VFA concentration, accompanied in some cases by high lactate concentration. Addition of YC did not affect the incidence or time (7.00 ± 0.62d) to cause the digestive upset. However, YC reduced ($P < 0,05$) the foam strength on the day after the digestive upset.

Keywords: Heifer, Rumen Fermentation, Digestive Upset, Yeast Culture

EFFECTO DE CENIZAS PROCEDENTES DE LA OBTENCIÓN DE ENERGÍA RENOVABLE A PARTIR DE BIOMASA RESIDUAL SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO DE DIETAS BASADAS EN HENO DE ALFALFA

Romero-Huelva, M, Martín-García, A. I., Nogales, R. y Molina-Alcaide, E.
Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1, 18008 Granada
manuel.romero@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

El 50% de las energías alternativas o renovables son producidas en plantas de biomasa (PER 2005-2010). El Plan Energético Europeo, aprobado en el año 2008, y el Plan Nacional de Energías Renovables para el periodo 2005-2010, tienen como objetivo el fomento de este tipo de energías. Las plantas de biomasa generan grandes cantidades de cenizas, entre 2,5-5-% por MS de biomasa procesada (García Almiñana y Solé Xam-mar, 2005). Su utilización es escasa y su almacenamiento genera problemas medioambientales y económicos. El empleo de cenizas para la elaboración de mezclas minerovitamínicas para el ganado podría no solo contribuir al reciclado de las mismas sino también a la reducción del coste de la alimentación del ganado. El objetivo de este trabajo es valorar el efecto de la adición de cenizas, provenientes de la generación de energías renovables a partir de distintos tipos de biomasa residual, sobre la fermentación ruminal *in vitro* de dietas prácticas para rumiantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó un sistema *in vitro* de cultivo no renovado de microorganismos ruminales (Theodorou et al., 1994). Las dietas experimentales estaban constituidas por heno de alfalfa (dieta HA) y una mezcla (70:30 en base a materia orgánica) de HA y concentrado compuesto de cebada y habas (5:3) (dieta HAC). Las cenizas estudiadas procedían de plantas de incineración de residuos de la madera (ENCE, Huelva y TRADEMA, Jaén); subproductos del olivar (EL TEJAR, Córdoba y LA LOMA, Jaén) y desechos de invernaderos (ALBAIDA, Almería). Se realizaron dos períodos idénticos de incubación, cada uno con dos series de incubación de 24 y 72 h. En botellas de vidrio de 120 ml se incubaron, por triplicado, 500 mg de materia orgánica de la dieta experimental correspondiente sin cenizas o con 10 mg de cada tipo de cenizas. El primer día de cada serie de incubación, cada botella se inoculaba con 50 ml de una mezcla (1:4 vol:vol) de líquido ruminal y una solución tampón (Goering y van Soest, 1970). El contenido del rumen se obtuvo antes de la primera toma de alimento del día de tres cabras de raza granadina ($46,9 \pm 2,15$ kg PV) dotadas de cánula ruminal, se mezcló y se filtró, de acuerdo con el protocolo de Theodorou et al. (1994). Se midió la presión y el volumen de gas producido a las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas tras la inoculación. Al final de las series de incubación de 24 y 72 horas se tomaron muestras de gas para determinar su concentración en CH₄, se abrieron las botellas, se midió el pH del contenido y se detuvo la fermentación introduciendo las botellas en hielo. A continuación, se tomaron alícuotas para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y amonio como se describe en Cantalapiedra et al. (2009). La producción de gas se ajustó al modelo de France et al. (2000): $y = A [1 - e^{-ct}]$ donde y representa la producción acumulada de gas (ml), t el tiempo de incubación (h), A la asíntota (gas total, ml) y c es la tasa de producción de gas (h⁻¹). La composición mineral de las cenizas se analizó mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer HGA500, EE.UU.). El contenido en carbono y nitrógeno de las cenizas se determinó en Leco TruSpec CN (St. Joseph, MI, EE.UU.). La concentración de N-NH₃ se determinó colorimétricamente siguiendo la metodología descrita por Weatherburn (1967). La concentración en AGV se determinó mediante cromatografía gaseosa, según la técnica descrita por Isac et al. (1994). La concentración de CH₄ en el gas producido se analizó mediante cromatografía gaseosa. El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó siguiendo un modelo univariante del procedimiento GLM del programa SPSS 15.0[®]. Las diferencias entre medias fueron analizadas empleando el test de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición en minerales de las cenizas empleadas aparece en la Tabla 1. Se observan importantes diferencias entre las distintas cenizas, sobre todo, en cuanto a las concentraciones de Ca, Mg y K (macrominerales) y de Fe, Mn, Cu y Pb (microminerales). El tipo de ceniza y la adición de estas no afectaron ($P > 0,2$) a los valores de pH, concentración de amonio, gas producido, concentración de metano, A y c y producción de AGV tras 24 horas de incubación de las dietas (Tabla 2). Varadyová et al. (2007) tampoco observaron diferencias significativas en los valores de AGV al añadir cenizas volcánicas a la dieta, aunque sí encontraron un aumento en la producción de gas y la concentración de CH₄. Las diferencias observadas entre nuestros datos y los de Varadyová et al. (2007) podrían deberse a diferencias en la cantidad y tipo de minerales adicionados o en las características del líquido ruminal empleado como inóculo (Molina et al., 1997). La ausencia de diferencias significativas en los resultados de concentración de amonio obtenidos, nos indica que no existen diferencias en la degradabilidad de las proteínas y/o incorporación de N-NH₃ por parte de los microorganismos ruminales. Las concentraciones de N-NH₃ obtenidas tras 24 h de incubación se encontraron dentro del rango óptimo para el crecimiento microbiano (Mehrez et al., 1997) probablemente debido a que la solución tampón empleada (Goering y Van Soest, 1970) estaba enriquecida con N-NH₃. La dieta afectó significativamente a los valores de pH, c, producción de ácido acético y producción de gas a las 24 h ($P = 0,036$; $0,044$; $0,039$; $0,021$, respectivamente). Los valores de A obtenidos son mayores que los observados por Khelil (2008) empleando dietas de buena calidad, probablemente debido al uso de una metodología distinta a la que se ha seguido en el presente trabajo para la preparación del inóculo ruminal. El procedimiento de Theodorou et al. (1994), empleado en este trabajo, probablemente permite la presencia de comunidades microbianas más diversas y numerosas en el inóculo, tanto de las asociadas a fibra como libres. Sin embargo, los valores de c observados en nuestro trabajo son similares a los encontrados por Khelil (2008). Las concentraciones de CH₄ obtenidas se encontraban en el rango de los valores observados por Jayanegara et al. (2008) para dietas similares y utilizando el mismo sistema *in vitro*. El hecho de que no hayan aparecido interacciones ceniza × dieta significativas ($P > 0,1$) indica que la ausencia de efectos de la adición de cenizas es independiente de la dieta empleada (HA o HAC).

La adición de cenizas de distinto origen no produce efectos significativos sobre los parámetros de fermentación de las dietas estudiadas. No obstante, sería necesario estudiar la biodisponibilidad de los minerales, así como los efectos beneficiosos y adversos que puedan derivarse, tanto para los microorganismos ruminales como para el animal.

Tabla 1. Composición de las cenizas empleadas

	g/kg	C	N	P	K	Ca	Mg	Na	C/N
ENCE		82,1	0,36	1,69	27,7	147	20,6	5,48	228
TRADEMA		18,4	0,195	1,02	6,40	63,7	9,73	2,42	97
TEJAR		-	0,07	9,16	23	98	43,3	5,98	-
LOMA		24,2	1,13	4,17	57,8	52,2	15,1	2,83	21
ALBAIDA		63,9	2,01	2,66	30,7	60,8	18,1	8,23	32
	mg/kg	Fe	Mn	Cu	Zn	Cd	Ni	Pb	B
ENCE		6.290	4.635	48	110	<0,2	52	6	220
TRADEMA		16.594	386	247	2064	<0,2	52	432	205
TEJAR		28.767	565	113	218	-	-	-	-
LOMA		6.283	172	181	274	<0,2	30	67	560
ALBAIDA		9.760	369	88	169	<0,2	14	2	176

Tabla 2. Efecto de la adición de distintos tipos de cenizas y de la dieta sobre los valores medios de pH, concentración de amonio, producción de gas, concentración de metano, producción total de gas (A), tasa de producción de gas (c) y producción de AGV tras 24 horas de incubación

	Ceniza ¹						Dieta		P-valor ²			EEM ³
	0	1	2	3	4	5	HA	HAC	Cz	D	CzxD	
pH	6,72	6,75	6,74	6,74	6,74	6,73	6,75	6,72	0,408	0,036	0,371	0,01
NH ₄ , mg/100 ml	29,5	29,9	30,6	28,7	28,7	29,6	28,2	30,8	0,742	0,490	0,409	0,33
Producción gas, ml	103	102	101	100	101	101	97	106	0,453	0,021	0,679	0,97
Prod. gas, ml/g MO	206	203	203	200	202	203	194	211	0,518	0,025	0,728	1,3
CH ₄ , ml/100 ml gas	18,6	17,6	18,0	17,8	17,3	17,7	17,9	17,8	0,732	0,656	0,375	0,24
A, ml	127	125	125	125	124	125	115	135	0,201	0,068	0,800	1,4
c, h ⁻¹	0,071	0,071	0,071	0,069	0,072	0,072	0,078	0,064	0,795	0,044	0,556	0,001
AGVs totales, mmol/d	2,11	2,09	2,09	2,08	2,20	2,13	2,12	2,11	0,922	0,928	0,376	0,03
C2, mmol/100 mol	64,2	64,0	64,2	64,4	64,1	64,3	65,8	62,6	0,937	0,039	0,364	0,02
C3, mmol/100 mol	21,7	21,8	21,7	21,8	21,8	21,7	21,9	21,6	0,915	0,715	0,388	0,01
iC4, mmol/100 mol	0,86	0,85	0,85	0,82	0,85	0,84	0,83	0,86	0,833	0,658	0,428	0,001
C4, mmol/100 mol	10,0	10,1	10,0	9,78	10,1	10,0	8,22	11,8	0,768	0,092	0,388	0,005
iC5, mmol/100 mol	1,29	1,29	1,24	1,23	1,23	1,25	1,22	1,29	0,940	0,563	0,332	0,001
C5, mmol/100 mol	1,93	1,98	1,94	1,93	1,94	1,92	1,98	1,90	0,757	0,479	0,508	0,001
Acético/propiónico	2,97	2,95	2,98	2,97	2,95	2,97	3,00	2,93	0,871	0,591	0,172	0,02

¹0: sin cenizas, 1: ENCE, 2: TRADEMA, 3: TEJAR, 4: LOMA, 5: ALBAIDA; ²Cz: ceniza, D: dieta, CzxD: interacción ceniza × dieta. ³EEM: error estándar de la media (n=72).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D., Martín-García, A. I. & Molina-Alcaide, E. 2009. *J. Anim. Sci.* 87:622-631.
- García Almiñana, D. & Solé Xam-mar, C. 2005. <https://upcommons.upc.edu/revistes>.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., López, S. & Bannink, A. 2000. *Br. J. Nutr.* 83:143-150.
- Goering, M. K. & van Soest, P. J. 1970. *Agric. Handbook*. Nº 379.
- Isac, M. D., García, M. A., Aguilera, J. F. & Molina Alcaide, E. 1994. *Arch. Tieremahr.* 46:37-50.
- Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2008. *Anim. Feed. Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.10.011.
- Khelil, H. 2008. Master's thesis.
- Mehrez, A.L., Orskov, E.R. & McDonald, I. 1977. *Br. J. Nutr.* 38: 437-443.
- Molina Alcaide, E., García, M. A. & Aguilera, J. F. 1997. *Livest. Prod. Sci.* 52:39-47.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Varadyová, Z., Styriaková, I. & Kisidayová, S. 2007. *Small Ruminant Res.* 73:58-66.
- Weatherburn, M. W. 1967. *Anal. Chem.* 39:971-974.

Agradecimientos: trabajo financiado por la Junta de Andalucía (Proy. Excelencia P05-AGR-0408).

EFFECT OF DIFFERENT ASHES FROM BIOMASS ALTERNATIVE ENERGY PRODUCTION ON IN VITRO RUMINAL FERMENTATION OF DIETS BASED ON ALFALFA HAY

ABSTRACT: Batch cultures of mixed rumen micro-organisms were used to study the ruminal fermentation promoted by diets based on alfalfa hay (AH) and AH and concentrate (AHC) without or with ashes from renewable energy produced with residual biomass (wood, olive oil extraction and greenhouses residues). Differences in mineral composition between ashes were observed. Kinetics of gas production were valuated based on the model $y = A [1 - e^{-ct}]$. There was no effect either of ash type and its addition on pH, ammonia concentration, gas production, methane concentration, total gas production (A), rate of gas production (c) and production of total and individual volatile fatty acids (VFA) after 24 h of incubation. Diet had a significant effect on pH, rate of gas production, production of acetic acid and gas production after 24 h of incubation (P = 0.036 and 0.044 and 0.039; 0.021, respectively). Results from this experiment indicate that ashes from different residual biomass can be included in diets based on alfalfa hay without compromising ruminal fermentation.

Keywords: ash, renewable energy, residual biomass, ruminal fermentation, methane.

UTILIDAD DEL HEXATRIACONTANO (C₃₆) COMO MARCADOR DE TRÁNSITO DIGESTIVO, Y EFECTO DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO SOBRE LA UTILIDAD DEL Cr-EDTA Y DEL YbCl₃ COMO MARCADORES DE FLUJO

Keli^{1,2}, A., de Vega¹, A., Askar^{1,3}, A.R. y Guada¹, J.A.

¹ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. España. avega@unizar.es.

² Unité de Recherche sur les Productions Animales. INRA-Tanger. 78 Bd. Sidi Mohamed Ben Abdellah. 90000 Tánger. Marruecos. ³ Animal and Poultry Nutrition Department. Desert Research Center. P. O. Box 11753. El-Matareya, Cairo, Egipto.

INTRODUCCIÓN

El tiempo de retención del alimento en los diferentes compartimentos del tracto digestivo de los ruminantes es uno de los factores que más afectan al lugar y a la tasa de digestión, y por tanto a la cantidad y tipo de nutrientes que llegan al duodeno (Ellis, 1978). Su conocimiento, por tanto, es fundamental en muchos de los estudios de nutrición llevados a cabo con este tipo de animales, y para este fin se ha sugerido la utilización de numerosas sustancias indicadoras (marcadores). Para la estimación de los parámetros de tránsito, la recuperación cuantitativa del marcador en las heces es deseable, aunque no esencial siempre que se mantenga constante durante el periodo de medición. Aunque la mayoría de los marcadores de fase líquida cumplen este requisito, los de fase sólida presentan una variabilidad mucho mayor, probablemente debida a las diferencias de densidad entre el indicador y la digesta, y a la capacidad de aquél de disociarse de esta última. En el caso de las estimaciones de flujo y de digestibilidad en diferentes tramos del tracto digestivo, es imprescindible que la recuperación de los marcadores a la salida de cada uno de ellos sea completa. El Cr-EDTA (fase líquida) y el YbCl₃ (fase sólida) son dos de los marcadores más utilizados en estudios de cinética digestiva, aunque últimamente se ha propuesto el uso de algunos alcanos de cadena larga como marcadores tanto de tránsito (Giráldez et al., 2006) como de digestibilidad ruminal (Askar et al., 2005). Además de por procesos de absorción y metabolismo, la recuperación de un determinado marcador puede estar también condicionada por el procedimiento analítico empleado para su determinación (Vicente et al., 2004). El objetivo del presente trabajo fue comprobar la utilidad del alcano C₃₆ como marcador de tránsito de la fase sólida de la digesta, así como el efecto del tipo de patrón utilizado en la calibración analítica sobre la concentración de Cr-EDTA y de YbCl₃ en el contenido de diferentes tramos del tracto digestivo, incluyendo las heces, y por tanto sobre las estimaciones de flujo a través de los mismos y sobre la recuperación fecal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron nueve ovejas de raza Rasa Aragonesa, adultas, vacías y secas (43,4±1,76 kg), que consumieron una ración a base de paja de cebada *ad libitum* y 186 g de grano de cebada (materia seca) con un 4% de urea. Tras un periodo de adaptación a la dieta de 14 días, durante el cual se fijó el nivel de ingestión de los animales al 95% de *ad libitum*, se realizó un balance de digestibilidad de una semana, tras tres días de adaptación a jaulas de metabolismo. El noveno día de adaptación a la dieta se administraron a tres animales dosis únicas de 50 ml de una solución de Cr-EDTA (2770 mg Cr/l), 100 ml de una solución de YbCl₃ (100 mg Yb/l) y 200 mg de C₃₆ (impregnados en 1,5 g de papel), tomándose posteriormente muestras de heces, directamente del recto, a intervalos crecientes de tiempo y durante cinco días, con el fin de estimar los parámetros de cinética de tránsito. Desde el primer día de adaptación a las jaulas de metabolismo, y durante todo el periodo de balance, se administraron, a todos los animales, dosis diarias de 120 ml de Cr-EDTA (100 mg/l) y de 120 ml de YbCl₃ (100 mg/l), distribuidas en seis alícuotas de 20 ml cada 4 horas. Terminado el balance se sacrificó a los animales, pesándose el contenido de abomaso, duodeno, ileon, ciego y ampolla rectal, que fue muestreado para el posterior análisis de Cr e Yb y la determinación del flujo a través de cada tramo digestivo. La determinación de Cr e Yb se llevó a cabo según el método propuesto por de Vega y Poppi (1997), usando dos patrones diferentes para establecer la curva de calibración: 1.- teniendo en cuenta el efecto de la matriz (MX, Vicente et al., 2004) o 2.- usando agua destilada (DW). Las curvas de excreción fecal de los marcadores de tránsito fueron ajustadas al modelo propuesto por Grovum y Williams (1973) con objeto de obtener los parámetros de cinética de tránsito en el tracto

digestivo. Los parámetros de cinética de tránsito, flujo a través de los diferentes tramos, y recuperación fecal de Cr e Yb obtenida a partir de la producción fecal registrada durante el periodo de balance, fueron sometidos a análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (versión 8.01), y considerando el tipo de marcador, el patrón de calibración y la interacción entre ambos, según el caso, como fuentes de variación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque las concentraciones de Cr e Yb fueron superiores cuando se prepararon los patrones con la matriz correspondiente, este hecho no afectó ($P>0,05$) ni a los ritmos fraccionales de tránsito lento (K_1) y rápido (K_2), ni al tiempo medio de retención total (TMRT) (Tabla 1). Comparado con Cr e Yb, el C_{36} proporcionó menores valores de K_1 y mayores de TMRT ($P<0,001$), que no difirieron entre aquéllos. Los valores de K_2 fueron, a su vez, superiores ($P<0,05$) con el Cr, sin aparecer diferencias ($P>0,05$) entre Yb y C_{36} . A pesar de que se considera que el $YbCl_3$ es un marcador de fase sólida, su comportamiento similar al del Cr-EDTA indicaría una asociación a las partículas más pequeñas, que se comportarían como solutos (Faichney, 1993).

Los flujos de digesta estimados con Cr e Yb estuvieron afectados por el tipo de patrón utilizado en la calibración analítica (Tabla 2), al igual que lo fue la recuperación fecal de ambos marcadores (Tabla 3) ($P<0,001$). Utilizando el patrón MX, los flujos estimados con Cr e Yb fueron similares, mientras que usando el patrón DW se obtuvieron mayores valores con el Cr en todos los casos. Además, el uso del patrón DW condujo a la estimación de mayores flujos con ambos marcadores. La recuperación fecal de ambos marcadores (Tabla 3) fue similar y completa cuando fueron analizados utilizando el patrón MX para la curva de calibración, mientras que cuando se usó el patrón DW la recuperación fue incompleta en ambos casos, y de forma mucho más acusada en el caso del Cr.

De los resultados del presente trabajo se puede concluir que el empleo de patrones preparados con la matriz correspondiente en cada caso es imprescindible para la obtención de concentraciones fiables. Este hecho es importante para el cálculo de las recuperaciones fecales de los marcadores o para la estimación de los flujos de digesta, aunque tiene menos importancia cuando se estudia la cinética de tránsito, por estar los parámetros obtenidos basados en valores relativos (dependen de la pendiente de la curva de excreción fecal, y no de las concentraciones absolutas). Por otra parte, el alcano C_{36} parece ser un marcador de cinética de tránsito de la fase sólida mucho más adecuado que el $YbCl_3$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Askar, A. R., Guada, J. A., Balcells, J., de Vega, A. & Castrillo, C. 2005. *Anim. Sci.* 81: 57-65.
- de Vega, A. & Poppi, D. P. 1997. *J. Agric. Sci.* 128: 207-215.
- Ellis, W. C. 1978. *J. Dairy Sci.* 61: 1828-1840.
- Faichney, G. J. 1993. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CABI, Wallingford. pp 53-85.
- Giráldez, F. J., López, S., Lamb, C. S. & Mayes, R. W. 2006. *Livest. Sci.* 100: 195-202.
- Grovum, W. L. & Williams, V. J. 1973. *Br. J. Nutr.* 30: 313-329.
- Vicente, F., Sarraseca, A., de Vega, A. & Guada, J. A. 2004. *J. Sci. Food Agric.* 84: 2035-2040.

Tabla 1. Ritmos fraccionales de tránsito lento (K_1) y rápido (K_2), y tiempo medio de retención total (TMRT) de Cr-EDTA, $YbCl_3$ y C_{36} en función del patrón utilizado en la calibración analítica.

	Marcador (M)			SEM	Patrón (P)		SEM	Significación	
	C_{36}	Cr	Yb		MX	DW		M	P
K_1 (h^{-1})	0,036 ^b	0,070 ^a	0,063 ^a	0,0043	0,059	0,054	0,0034	0,0006	0,3898
K_2 (h^{-1})	0,093 ^b	0,135 ^a	0,070 ^b	0,0126	0,101	0,098	0,0103	0,0140	0,8264
TMRT (h)	61,80 ^a	25,69 ^b	29,39 ^b	3,630	37,92	40,00	2,964	<,0001	0,6317

^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) entre marcadores; SEM: error estándar de la media; MX: patrón preparado con matriz; DW: patrón preparado con agua destilada.

Tabla 2. Flujos de digesta (kg MS/día) estimados con Cr o con Yb, y teniendo en cuenta (MX) o no (DW) el efecto de la matriz en la preparación de los patrones de calibración.

Flujo	MX		DW		RSD	Significación		
	Cr	Yb	Cr	Yb		P	M	P*M
Abomasal	_b 0,57	_b 0,59	_a 1,62 ^a	_a 1,26 ^b	0,3168	<,0001	0,1210	0,0889
Duodenal	_b 0,78	0,80	_a 1,10 ^a	0,84 ^b	0,1124	<,0001	0,0042	0,0008
Ileal	_b 0,45	_b 0,46	_a 0,91 ^a	_a 0,70 ^b	0,1256	<,0001	0,0230	0,0112
Cecal	_b 0,32	_b 0,33	_a 0,64 ^a	_a 0,48 ^b	0,0494	<,0001	<,0001	<,0001
Fecal	_b 0,34	_b 0,34	_a 0,52 ^a	_a 0,39 ^b	0,0202	<,0001	<,0001	<,0001

^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre Cr e Yb para un mismo patrón.

_{a, b} Subíndices diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre patrones para un mismo marcador; RSD: desviación estándar residual; P: patrón; M: marcador; MX: patrón preparado con matriz; DW: patrón preparado con agua destilada.

Tabla 3. Recuperación fecal (%) de Cr e Yb en función del patrón usado para la calibración analítica.

Marcador (M)	Patrón (P)		RSD	P	Significación	
	MX	DW			M	P*M
Cr	^a 100,5	^b 66,5 _b	2,2928	<,0001	<,0001	<,0001
Yb	^a 100,6	^b 89,1 _a				

^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre patrones para un mismo marcador.

_{a, b} Subíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre marcadores para un mismo patrón; RSD: Desviación estándar residual; P: patrón; M: marcador; MX: patrón preparado con matriz; DW: patrón preparado con agua destilada.

THE FEASIBILITY OF HEXATRIACONTANE (C₃₆) AS TRANSIT MARKER, AND THE EFFECT OF ANALYTICAL PROCEDURE ON THE UTILITY OF Cr-EDTA AND YbCl₃ AS FLOW MARKERS

ABSTRACT

An experiment was performed to assess the feasibility of hexatriacontane (C₃₆) as transit marker in ewes, and the effect of analytical procedure (standard preparation with blank digesta (MX) or with distilled water (DW)) on estimation of Cr and Yb concentrations in different segments of the gut, and its effect on digesta flow and on faecal recovery estimates. Although faecal concentrations of Cr and Yb were higher with MX, this did not affect slow rate of passage (K₁), fast rate of passage (K₂) or total mean retention time (TMRT) estimated from faecal marker excretion curves (P>0.05). However, there were lower K₁ and higher TMRT values for C₃₆ (P<0.001), with no differences between Cr and Yb. The values of K₂ were higher for Cr (P<0.05), with no differences (P>0.05) between Yb and C₃₆. Digesta flows and faecal recoveries of Cr and Yb were affected by the standard type (P<0.001), MX leading to similar estimates of digesta flow with both markers (P>0.05). Values estimated with DW were significantly higher for Cr (P<0.05). Standard DW produced higher flow values than MX with both markers. Full recovery of Cr and Yb was obtained with MX, whereas recovery was much lower with DW, especially for Cr.

Keywords: markers, passage rate, digesta, analytical method.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DEL TIPO DE FORRAJE Y DE LA PROPORCIÓN FORRAJE – CONCENTRADO SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL EN CABRAS Y EN FERMENTADORES DE FLUJO SIMPLE CONTINUO.

Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R. y Molina-Alcaide, E.
Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas),
Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España.
Correo electrónico: molina@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Los fermentadores de flujo continuo (FFC) permiten el estudio de la fermentación ruminal de forma más simple y menos costosa que los ensayos in vivo. Sin embargo, las comparaciones directas rumen – FFC son escasas y las existentes se han llevado a cabo con fermentadores de flujo doble continuo y ganado vacuno (Hannah et al., 1986; Mansfield et al., 1995; Muetzel et al., 2008). La información relativa a pequeños rumiantes es escasa (Carro et al., 2009; Molina et al., 2009) y los diferentes estudios han empleado ingestas variables entre 10,5 (Muetzel et al., 2008) y 90 (Slyter y Rumsey, 1991) g de materia seca (MS)/día/L de volumen efectivo del fermentador. Dado el efecto del pH sobre la fermentación ruminal (Calsamiglia et al., 2008) su estudio parece esencial en lo que a la simulación in vitro se refiere. El objetivo del presente trabajo es comparar los efectos del tipo de forraje (F) y de la relación forraje:concentrado (F:C) sobre la fermentación ruminal en el rumen de caprino y en fermentadores de flujo simple continuo (FFSC). Además, se analiza el efecto del pH utilizando suministrando a los FFSC 30 ó 45 g MS/día.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro cabras de raza granadina ($46,3 \pm 2,96$ kg PV), canuladas en rumen y ocho FFSC (Miettinen y Setälä, 1989) reciben cuatro dietas constituidas por forraje (heno de gramíneas o de alfalfa) y concentrado en alta (70%) o baja (30%) proporción. Los animales reciben las dietas para cubrir un 120% de sus necesidades de mantenimiento (Prieto et al., 1990), y se adaptan a estas durante 10 días, tras los cuales se realiza un ensayo de digestibilidad en jaulas metabólicas de 7 días de duración y una recogida seriada, cada 2 h, del líquido ruminal en el intervalo 0-12 h en el día 18, para medir pH y concentración de N amoniacal (N-NH₃) y de ácidos grasos volátiles (AGV). Dos días más tarde se extrae de cada animal suficiente contenido ruminal para inocular dos fermentadores, que reciben 30 o 45 g MS de la misma dieta que consumía el animal donador. Tras 7 días de adaptación se recoge, durante 3 días, el efluente de cada fermentador para analizar su composición. En el cuarto día tras la adaptación se realiza el mismo muestreo seriado descrito para los animales. Durante todo el ensayo se registró el pH de los fermentadores dos veces al día y sólo se adicionó NaOH 5 N cuando su valor fue inferior a 5,6. Las diferencias entre medias se consideran significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios previos que comparan rumen y FFC (Hannah et al., 1986; Mansfield et al., 1995; Carro et al., 2009) han utilizado valores expresados como proporciones o concentraciones para obviar las diferencias existentes en la ingesta de MS en animales y fermentadores. Sin embargo, la cantidad de dieta administrada a los FFC y animales en relación al volumen del fermentador y del rumen, respectivamente puede afectar esos valores (Carro et al., 2009). Por ello, este trabajo pretende evaluar el grado en el que se simulan in vitro los efectos del tipo de forraje y de la relación F:C sobre la fermentación ruminal, y no comparar directamente los valores de dichos parámetros obtenidos en el rumen y en FFSC. Los efectos F y F:C sobre el pH y las concentraciones de N-NH₃ y AGV (Tabla 1) eran similares en rumen y en los FFSC alimentados con 30 g MS, probablemente debido a que el pH alcanzado en estos fermentadores (6,22 – 6,53) es comparable al del rumen (6,21 – 6,43) y no así cuando los fermentadores se alimentaron con 45 g MS (5,70 – 6,08). Sin embargo,

estos últimos simularon adecuadamente el efecto F:C sobre el pH, y en ellos se observó una interacción F x F:C en la concentración de N-NH₃ al igual que ocurría en el rumen. La relación acético:propiónico (C2/C3) se simuló adecuadamente en cuanto al efecto F:C, pero el hecho de que in vitro existieran diferencias (P < 0,05) entre las dos dietas con baja proporción de concentrado puede explicar la mala simulación del efecto F. Los FFSC alimentados con 30 g MS simularon adecuadamente los efectos de F y F:C sobre la digestibilidad aparente de la materia orgánica. Por el contrario, sólo se simulaba correctamente el efecto F:C sobre la digestibilidad de la FND, debido a la incapacidad de reproducir las diferencias (P > 0,05) encontradas in vivo entre las dos dietas con baja proporción de concentrado. Los efectos de F y F:C sobre la digestibilidad aparente de los carbohidratos no fibrosos fueron diferentes en animales y en FFSC, probablemente debido a que las diferencias (P < 0,05) encontradas en los fermentadores entre dietas con baja proporción de concentrado no se observaron en rumen (P > 0,05).

Tabla 1. Efectos del tipo de forraje (F) y de la relación forraje:concentrado (F:C) sobre el pH, concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGV), relación acético:propiónico (C2/C3), digestibilidad aparente de la materia orgánica (DaMO) y de los carbohidratos no fibrosos (DaCNF) y de la digestibilidad de la fibra neutro detergente (DFND) en rumen de caprino y en fermentadores de flujo simple continuo alimentados con las dietas experimentales.

Parametro ²	Dietas ¹					Nivel significación (P =)			
	GF	AF	GC	AC	EEM	F	F:C	F × F:C	
pH	Cabras	6,43	6,43	6,21	6,26	0,055	0,63	< 0,001	0,71
	FFSCB ³	6,50 ^b	6,53 ^b	6,22 ^a	6,31 ^a	0,018	0,16	< 0,001	0,23
	FFSCA ⁴	6,08 ^d	5,79 ^b	5,94 ^c	5,70 ^a	0,013	< 0,001	< 0,001	0,29
N-NH ₃ , mg/dL	Cabras	12,9 ^a	22,9 ^b	30,1 ^b	31,0 ^b	1,9	< 0,001	< 0,001	0,002
	FFSCB	1,36 ^a	26,0 ^c	11,6 ^b	22,6 ^c	0,53	< 0,001	0,02	< 0,001
	FFSCA	1,94 ^a	26,2 ^d	7,10 ^b	22,4 ^c	0,27	< 0,001	0,17	< 0,001
AGV, mmol/L	Cabras	68,8 ^a	93,0 ^b	74,7 ^a	75,9 ^{ab}	4,2	< 0,001	0,12	0,002
	FFSCB	112 ^a	126 ^b	115 ^a	120 ^{ab}	1,3	< 0,001	0,66	0,11
	FFSCA	142 ^a	174 ^b	173 ^b	166 ^b	1,5	< 0,001	< 0,001	< 0,001
C2/C3	Cabras	4,45 ^b	3,95 ^{ab}	3,50 ^a	3,47 ^a	0,11	0,04	< 0,001	0,15
	FFSCB	3,06 ^a	3,94 ^b	2,85 ^a	3,06 ^a	0,038	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	FFSCA	2,57 ^b	2,92 ^c	1,80 ^a	1,77 ^a	0,020	< 0,001	< 0,001	< 0,001
DaMO, %	Cabras	67,7 ^a	68,9 ^a	80,5 ^b	77,4 ^b	0,53	0,09	< 0,001	0,07
	FFSCB	38,9 ^a	40,7 ^{ab}	44,1 ^b	44,0 ^b	0,58	0,48	0,003	0,46
	FFSCA	38,4	38,7	40,7	40,5	0,55	0,98	0,07	0,80
DaCNF %	Cabras	82,8 ^a	85,3 ^{ab}	93,0 ^b	89,8 ^{ab}	1,18	0,90	0,009	0,25
	FFSCB	38,1 ^a	53,7 ^b	48,0 ^{ab}	54,0 ^b	1,62	0,006	0,15	0,17
	FFSCA	41,5 ^a	55,1 ^b	49,7 ^{ab}	58,4 ^b	1,84	0,01	0,15	0,51
DFND, %	Cabras	63,6 ^b	55,4 ^a	71,8 ^c	67,2 ^b	0,39	< 0,001	< 0,001	0,07
	FFSCB	49,6 ^a	51,3 ^a	57,2 ^b	58,9 ^b	0,54	0,30	< 0,001	0,63
	FFSCA	44,3	40,2	45,8	42,1	0,85	0,11	0,12	0,83

¹ GF = 70% heno de gramíneas y 30% concentrado; AF = 70% heno de alfalfa y 30% concentrado; GC = 30% heno de gramíneas y 70% concentrado; AC = 30% heno de alfalfa y 70% concentrado, en base a materia seca

² Observaciones, n = 4; excepto parámetros de la fermentación ruminal, n = 28

³ FFSC alimentados con 30 g MS; ⁴ FFSC alimentados con 45 g MS

Los resultados encontrados indican que los FFSC tienen mayor potencial de simulación de lo que ocurre en el rumen de caprino cuanto mayor es la calidad de las dietas ensayadas. Esta observación está en desacuerdo con los resultados encontrados por Mansfield et al. (1995), quienes apuntaron a una peor simulación con FFSC alimentados con dietas ricas en

carbohidratos no fibrosos. Por el contrario, estudios previos de nuestro grupo (Moumen, 2003) ya apuntaban a una mejor simulación de la degradación de la MS en FFSC con dietas de calidad media (heno alfalfa mas concentrado) en comparación con dietas de peor calidad (hojas de olivo). Se observa una mejor reproducción de los efectos estudiados cuando el pH de los fermentadores es mas parecido al del rumen, de ahí la importancia del pH en la simulación ruminal (Wales et al., 2004; Calsamiglia et al., 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Calsamiglia, S., P. W. Cardozo, A. Ferret, y A. Bach. 2008. J. Anim. Sci. 86:702-711.
- Carro, M. D., M. J. Ranilla, A. I. Martín-García, y E. Molina-Alcaide. 2009. Animal. DOI: 10.1017/S1751731108003844
- Hannah, S. M., M. D. Stern, y F. R. Ehle. 1986. Anim. Feed Sci. Technol. 16:51-62.
- Mansfield, H. R., M. I. Erdres, y M. D. Stern. 1995. Anim. Feed Sci. Technol. 55:47-66.
- Miettinen, H., y J. Setälä. 1989. J. Agric. Sci. Finland. 61:463-473
- Molina-Alcaide, E., M. R. Pascual, G. Cantalapiedra-Hijar, E. Y. Morales-García, y A. I. Martín-García. 2009. DOI:10.2527/jas.2008-1263.
- Moumen, A. 2003. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Muetzel, S., Lawrence P., Hoffmann E.M., y K. Becker. 2008. Anim. Feed. Sci. Technol.doi: 10.1016/j.anifeedsci.2008.11.001.
- Prieto, C., J. F. Aguilera, L. Lara, y J. Fonollá. 1990. Br. J. Nutr. 63:155-163
- Slyter y Rumsey. 1963. J. Anim. Sci. 69:3055-3066
- Wales, W. J., E. S. Kolver, P. L. Thorne, y A. R. Egan. 2004. J. Dairy Sci. 87:1864-1871.

A COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF FORAGE TYPE AND FORAGE TO CONCENTRATE RATIO ON RUMINAL FERMENTATION IN GOATS AND SINGLE-FLOW CONTINUOUS-CULTURE FERMENTERS.

ABSTRACT: Eight single-flow continuous-culture fermenters (FFSC) and four rumen cannulated Granadina goats (46.3 ± 2.96 kg BW) were fed 4 experimental diets to evaluate whether the effects of forage type and forage to concentrate ratio on ruminal fermentation were adequately simulated in vitro. Diets included a forage (grass or alfalfa hay) and low (30%) o high (70%) proportion of concentrate and were tested in vitro at two different inputs (30 or 45 g DM/d) to analyse wheter or not the simulation ability was pH dependent. The F:C effect was adequately reproduced in FFSC on most of the analysed parameters, whereas the F effect was simulated in some parameters but not in others, indicating a better simulation with FFSC as the quality of diet increased. On the other hand, the lower pH reached with fermenters fed 45 g DM (from 5.70 to 6.08) compared to that in fermenters fed 30 g DM (from 6.22 to 6.53), led to a worse simulation, underlying the importance of pH for in vitro rumen simulation.

Keywords: rumen simulation, single-flow continuous-culture fermenters

EFFECTO DEL pH Y DEL NIVEL DE CONCENTRADO DE LA DIETA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INTERMEDIARIOS DE LA BIOHIDROGENACIÓN EN CULTIVO CONTINUO

M. C. Fuentes¹, S. Calsamiglia¹, y P.W. Cardozo¹
¹Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España
 maricarmen.fuentes@uab.es

INTRODUCCIÓN

El síndrome de grasa baja se caracteriza por una reducción en el contenido graso y por la alteración en la composición de ácidos grasos (AG) de la leche, con mayores cantidades de AG *trans*-C_{18:1} y ácido linoleico conjugado (ALC), al alimentar a las vacas con ciertas dietas (Palmquist et al., 1993). Se han propuesto varias teorías para explicar el síndrome de baja grasa en vacas, pero la que ha recibido más apoyo en la última década sugiere que la síntesis de grasa láctea se inhibe por ciertos AG *trans* (*trans*-10 C_{18:1} y *trans*-10, *cis*-12 CLA) que se producen como resultado de alteraciones en el proceso de biohidrogenación ruminal de los AG insaturados al alimentar a las vacas con dietas ricas en concentrado (Bauman y Griinari, 2003). Como normalmente se observa una reducción en el pH ruminal al alimentar a las vacas con dietas ricas en concentrado, se desconoce cuál es la causa real (el nivel de concentrado, el pH ruminal o ambos) que provoca este cambio en el proceso de biohidrogenación ruminal. Es evidente que debe existir una interacción significativa entre el nivel de concentrado y el pH ruminal en la biohidrogenación de los AG insaturados. Sin embargo, no existe literatura disponible en la que ambos factores se hayan estudiado simultáneamente para estudiar su contribución al flujo de AG en un sistema continuo. Por tanto, se llevó a cabo un experimento para estudiar el efecto del pH y del nivel de concentrado de la dieta sobre la producción de intermediarios de la biohidrogenación en un sistema de doble flujo continuo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 fermentadores de doble flujo continuo (Stern y Hoover, 1990) en dos períodos consecutivos de 8 días (5 d de adaptación y 3 d de muestreo). La temperatura (39°C) y la tasa de dilución sólida (5%/h) y líquida (10%/h) se mantuvieron constantes. El primer día de cada período los fermentadores se inocularon con líquido ruminal de una vaca canulada alimentada con una ración 60:40 forraje:concentrado (FC). Los tratamientos se organizaron en un diseño factorial 2 x 2, siendo los factores principales el pH (6,4 vs. 5,6) y la relación F:C de la dieta (baja en concentrado (BC) = 70:30 F:C vs. alta en concentrado (AC) = 30:70 F:C). Las dietas se diseñaron para ser isoproteicas (PB: 17,8%) y para aportar cantidades similares de AG totales (EE: 5,3%) y con una composición similar de ácido linoleico y linoléico (C_{18:2} y C_{18:3}). Se suministraron 95 g MS/d de las dietas dosificadas en tres veces al día a los fermentadores (0800, 1600, 2400). Durante los 3 días de muestreo a 1 hora post alimentación de la mañana se tomaron muestras del efluente para estudiar el perfil de AG. También se tomaron a las mismas horas muestras de líquido ruminal del fermentador para realizar técnicas de rt-PCR para estudiar cambios en las bacterias involucradas en los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal [*Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* subgrupo productor de ácido esteárico (*Butyrivibrio* subgrupo AS) y *Butyrivibrio fibrisolvens* subgrupo productor de ácido vaccénico (*Butyrivibrio* subgrupo AV)].

El diseño estadístico utilizado fue de bloques completos al azar con 4 tratamientos y 2 períodos, considerando el período como efecto bloque. Los resultados fueron analizados utilizando el programa PROC MIXED del SAS (V. 9.1, SAS Institute, Cary, NC). Las diferencias se declararon a P < 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La proporción de C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1} y *cis*-9, *trans*-11 ALC fue menor y la de *trans*-10 C_{18:1}, *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} y *trans*-10, *cis*-12 ALC mayor a pH 5,6 que a

pH 6,4 (Tabla 1). El incremento en *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6} y C_{18:3n-3} refleja la inhibición de la biohidrogenación aparente de *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6} y C_{18:3n-3} a pH bajo.

La proporción de *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3} y *trans*-10, *cis*-12 ALC fue mayor, y la de *trans*-10 C_{18:1} y *trans*-11 C_{18:1} menor en la dieta AC que en la BC en el efluente de 1 h postalimentación (Tabla 1). Estos resultados sugieren que la biohidrogenación es más activa en la dieta BC que en la AC porque hay menos proporción de precursores de la biohidrogenación (*cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3}) y más proporción de intermediarios de la biohidrogenación, sobretodo AG *trans*-C_{18:1}, en el efluente. La proporción de *trans*-10, *cis*-12 ALC fue mayor en la dieta AC que en la BC. Varios estudios han demostrado que incrementar los niveles de carbohidratos fácilmente digestibles en la dieta se ha asociado con mayores proporciones de *trans*-10, *cis*-12 ALC en la grasa de la leche (Kalscheur et al., 1997; Griinari et al., 1998; Piperova et al., 2000). Sin embargo, Griinari et al. (1998) y Kalscheur et al. (1997) observaron que las dietas ricas en concentrado se acompañaban de menores pH ruminales. Debido a que in vivo el cambio en pH ocurre como consecuencia de alimentar con dietas ricas en concentrado, en los resultados observados se confunden los efectos entre la acidosis ruminal y los efectos del nivel de concentrado en la dieta. Los resultados de este experimento indican que el pH es el factor principal que afecta el proceso de biohidrogenación ruminal y que resulta en la acumulación de *trans*-10, *cis*-12 ALC, sin embargo, la proporción de *trans*-10, *cis*-12 ALC en el efluente puede también estar afectada por altos niveles de concentrado en la dieta, pero en menor medida.

Hubo una interacción significativa entre dieta y pH en las concentraciones de DNA de *A. lipolytica* y *Butyrivibrio* subgrupo AV (Tabla 2). La concentración de DNA de *A. lipolytica* DNA se redujo a pH 5,6 en ambas dietas y su concentración a pH 6,4 fue mayor en la dieta AC que en la BC. La concentración de DNA de *Butyrivibrio* subgrupo AV se redujo a pH 5,6 en ambas dietas pero esta reducción fue mayor en la dieta AC que en la BC y la concentración a pH 6,4 fue similar entre las dietas. Sorprendentemente, la concentración de DNA de *Butyrivibrio* subgrupo AS tendió a ser mayor a pH 5,6 que a pH 6,4 (Tabla 2) a pesar de la importante reducción en la proporción de C_{18:0} en el efluente a 1 h postalimentación (Tabla 1). Esto podría sugerir que *Butyrivibrio* subgrupo SA esté solo jugando un papel menor en la producción total de C_{18:0} o que su actividad metabólica puede no ser proporcional a la concentración del gen 16S rRNA.

Tabla 1. Efecto del nivel de concentrado de la dieta (BC: 70:30 F:C, AC: 30:70 F:C) y del pH (6,4 vs. 5,6) sobre el perfil de ácidos grasos (g/100g C₁₈-AG) del efluente 1 h postalimentación.

	Dieta				ESM	P-valor		
	BC		AC			C	P	C × P
	6,4	5,6	6,4	5,6				
C _{18:0}	47,8	11,8	48,5	10,2	3,2	0,872	<0,001	0,683
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1,82	27,1	0,35	18,3	2,9	0,027	<0,001	0,095
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	5,71	1,06	3,21	0,39	0,46	0,008	<0,001	0,085
C _{18:2n-6}	17,7	27,4	18,9	31,8	1,2	0,049	<0,001	0,229
C _{18:3n-3}	3,53	5,11	4,97	7,92	0,33	<0,001	<0,001	0,064
c9 C _{18:1}	14,1	20,6	15,8	24,9	0,74	0,012	<0,001	0,077
t11,c15 C _{18:2} ²	0,15	1,04	0,12	1,18	0,10	0,430	<0,001	0,268
c9,t11 ALC	0,11	0,03	0,07	0,004	0,024	0,175	0,005	0,693
t10,c12 ALC	0,14	0,47	0,17	0,60	0,033	0,022	<0,001	0,128

¹C = nivel de concentrado, P = pH, y C × P = interacción concentrado por pH.

² t11,c15 C_{18:2} = *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}; c9,t11 ALC = *cis*-9, *trans*-11 CLA; t10,c12 ALC = *trans*-10, *cis*-12 ALC.

Tabla 2. Efecto del nivel de concentrado de la dieta (BC: 70:30 F:C, AC: 30:70 F:C) y del pH (6,4 vs. 5,6) sobre la cuantificación (pg/10 ng DNA) de *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio subgrupos AS y AV* en los días 6 a 8 de muestreo.

	Dieta				ESM	P-valor		
	BC		AC			C	P	C × P
	6,4	5,6	6,4	5,6				
<i>A. lipolytica</i>	42,5 ^b	0,91 ^c	111,4 ^a	0,48 ^c	9,7	0,002	<0,001	0,002
<i>B. fibrisolvens</i> AV	1314 ^a	557,7 ^b	1378 ^a	111,5 ^c	114	0,086	<0,001	0,028
<i>B. fibrisolvens</i> AS	405,5	653,3	438,2	525,3	141	0,611	0,093	0,396

^{a,b,c} Cuando la interacción es significativa ($P < 0,05$), diferentes superíndices en la misma fila indican que las medias difieren significativamente.

¹C = nivel de concentrado, P = pH, y C × P = interacción concentrado por pH.

CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento confirman que es el pH, y no la cantidad de concentrado en la dieta, el principal factor que afecta al proceso de biohidrogenación ruminal que resulta en la acumulación de *trans*-10, *cis*-12 ALC, AG asociado con la reducción en el porcentaje de grasa láctea observado in vivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauman, D. E., y J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.* 23:203-227.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, y K. V. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
- Kalscheur, K. F., B. B. Teter, L. S. Piperova, y R. A. Erdman. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2104-2114.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu, y D. M. Barbano. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76: 1753-1771.
- Stern, M. D., y W. H. Hoover. 1990. The dual flow continuous culture system. Pages 17-32 in *Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or Fermentation*. Northwest ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY.
- Piperova, L. S., B. B. Teter, I. Bruckental, J. Sampugna, S. E. Mills, M. P. Yurawecz, J. Fritsche, K. Ku, y R. A. Erdman. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *J. Nutr.* 130:2658-2674.

EFFECT OF pH AND LEVEL OF CONCENTRATE IN THE DIET ON THE PRODUCTION OF BIOHYDROGENATION INTERMEDIATES IN A DUAL FLOW CONTINUOUS CULTURE

ABSTRACT: Milk fat depression in cows fed high grain diets has been related to an increase in *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid concentration in milk. These fatty acids are produced in the rumen of cattle fed high concentrate diets that results in low ruminal pH. However, it is not clear if the main cause of the production of these fatty acids is the level of concentrate in the diet, ruminal pH or both. Results obtained in the present experiment indicate that low pH is the main factor affecting the accumulation of biohydrogenation intermediates related with milk fat depression.

Key words: biohydrogenation, concentrate, PCR, pH

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA AUSENCIA DE PROTOZOARIOS Y EL TIPO DE RACION SOBRE LA FERMENTACION Y SINTESIS MICROBIANA EN EL RUMEN.

Blanche, A., de la Fuente, G. y Balcells, J.

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, España.
blanche@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Los protozoos pueden representar el 50% de la masa microbiana ruminal y su actividad predatoria puede incrementar sustancialmente el reciclaje de nitrógeno en el rumen (Eugène et al., 2004). A pesar de su importancia, su efecto sobre el ecosistema ruminal y particularmente su contribución a la digesta duodenal ha sido escasamente analizada dadas las dificultades metodológicas que implica su determinación. Los datos existentes proceden, bien de ensayos “*in vitro*”, en los cuales el comportamiento de los ciliados puede verse alterado por las condiciones ambientales inducidas, o bien de estudios “*in vivo*”, en los cuales el efecto de los protozoos se ha establecido por comparación respecto a animales defaunados. Dicha eliminación de los protozoos ruminales se ha realizado mediante diferentes procedimientos cuya agresividad sobre el ecosistema ruminal ha sido fehacientemente demostrada (William y Coleman, 1992). Una alternativa a los procesos agresivos de defaunación es el aislamiento del animal, tras su nacimiento, de cualquier fuente de potencial de contaminación protozoaria. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto que la ausencia o la presencia de protozoos ruminales y el tipo de dieta sobre diversos parámetros de la fermentación ruminal, en especial sobre la eficiencia de síntesis de proteína microbiana.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente ensayo se utilizaron veinte corderos de la raza Rasa Aragonesa procedentes de partos dobles. Uno de los gemelos fue aislado de la madre tras el parto y criado en un ambiente libre de protozoos (Defaunado), y el segundo se utilizó como control y permaneció con el rebaño para asegurar una correcta colonización protozoaria. A los 6 meses de edad ambos grupos de corderos (Defaunado y Control) fueron divididos aleatoriamente en dos sub-lotes que fueron alimentados con dos raciones experimentales ($n=5$, 3 machos y 2 hembras; recibiendo ambos hermanos el mismo tipo de dieta). Las raciones consistieron en 100% heno de alfalfa o 50%-50% heno de alfalfa-cebada molida y en ambas raciones fueron suministradas a un nivel de 1,5 veces mantenimiento (AFRC, 1993). Los corderos fueron alojados en jaulas metabólicas y tras 15d de adaptación se determinó la digestibilidad aparente (7 días de balance, d16-d23) y la ruminal utilizando los n -alcanos como marcadores de flujo (Mayes et al., 1988). La síntesis microbiana se estimó mediante el uso de ^{15}N (42.7 mg $^{15}\text{N}/\text{d}$ distribuidos en 4 dosis: 2:00, 8:00, 14:00 y 20:00h) que fue administrado los 5 días previos al sacrificio (d19-d23). Los animales fueron sacrificados (d23) con Tiopental (10mg/kg PV) para proceder al muestreo de contenido digestivo: rumen, abomaso y duodeno. Tras determinar el pH, el contenido ruminal fue filtrado a través de dos capas de gasa y ambas fracciones, líquida y sólida se destinaron al aislamiento de las bacterias asociadas cada fracción (Martín-Orúe et al., 1998). La fracción líquida fue utilizada para determinar la concentración ruminal de amonio (Charney y Marbach, 1962), ácidos grasos volátiles (AGV) (Jouany, 1982) y protozoos ruminales (Dehority, 2003). Tanto los extractos microbianos como el contenido abomasal fueron liofilizados para determinar su contenido en nitrógeno (N), N-no amoniacal (NNA) y ^{15}N , siendo este último corregido en función de su abundancia natural las diferentes muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto los animales sin protozoos como los control mostraron un estado saludable durante todo el ensayo y no se detectaron diferencias en sus ritmos de crecimiento (273 g/d) durante la fase de cebo (entre los 45d y 90d). No obstante, los corderos que recibieron alfalfa presentaron una mayor ingestión de materia seca (MS) que los que recibieron una dieta mixta (881 vs. 721 g/d, $P<0,01$), aunque las diferencias no se reflejaron en la cantidad de materia orgánica digestible ingerida (MODI). La mayor digestibilidad de la dieta mixta (60 vs. 74%, $P<0,001$) compensó las diferencias en la ingestión de MS y MO. La presencia de

protozoos incremento la digestibilidad aparente de la MS en el tracto digestivo (66 vs. 68%, $P<0,05$) siendo estas diferencias especialmente manifiestas en los componentes fibrosos (incremento del 5,1% la FND y del 4,0% la FAD). La presencia de protozoos no incremento de forma significativa la digestibilidad ruminal aparente (43,6 vs. 42,2%, $P=0,40$) ni real (51,4 vs. 50,1%, $P=0,43$) dado el incremento manifiesto de la variación experimental.

Tabla 1. Efecto de la defaunación y la dieta sobre la ingestión, digestibilidad y la fermentación ruminal de corderos.

	Control		Defaunados		SEM <i>n</i> =5	Significación		
	Alfalfa	Mixta	Alfalfa	Mixta		Prot.	Dieta	PxD
Ingestión (g/d)								
MO	809	712	776	641	50,0	ns	*	ns
MOD	499	530	456	471	36,7	ns	ns	ns
Dig. Aparente (%)								
MO	61,5	74,3	58,5	73,4	0,79	*	***	ns
FND	50,2	48,1	43,4	44,7	1,42	**	ns	ns
FAD	50,2	43,4	44,2	41,5	1,41	*	**	ns
Dig. Ruminal MO (%)								
Aparente	37,9	49,3	39,4	45,1	1,57	ns	***	T
Real	44,8	57,9	46,6	53,6	1,53	ns	***	T
Parámetros ruminales								
pH	6,79 ^a	5,50 ^c	6,82 ^a	6,03 ^b	0,06	***	***	***
NH ₃ (mg/l)	103,9	136,1	78,1	1,8	26,2	**	ns	T
AGV totales (mM)	122,8	121,6	92,5	74,2	11,5	**	ns	ns
Proporciones (%)								
Acetato	77,6 ^a	66,1 ^b	82,7 ^a	56,6 ^c	2,27	ns	***	**
Propionato	15,0 ^b	19,1 ^{ab}	9,12 ^c	21,5 ^a	1,57	ns	***	*
Butirato	5,4	12,0	6,7	18,2	2,16	ns	***	ns
Acetato/Propionato	5,2 ^b	3,5 ^c	9,1 ^a	2,6 ^c	0,39	**	***	***
Protozoos (x10 ⁵)	0,37	13,9			2,26		**	

No se detectaron protozoos en los animales defaunados, mientras que la suplementación con concentrado incremento notablemente la concentración ruminal de los mismos en el grupo control ($3,7 \times 10^4$ vs. $1,4 \times 10^6$ células/ml; $P<0,01$). La ausencia de protozoos modificó la fermentación ruminal, reduciendo la concentración de AGV (122 vs. 83 mM; $P<0,01$) y de amonio (120 vs. 40 mg/l, $P<0,01$), descenso que reflejaría el incremento en los ritmos de reciclaje de proteína microbiana debido a la presencia de protozoarios (Eugène et al., 2004). El perfil de AGV fue también afectado, tanto por la presencia de protozoos como por la dieta, mostrando la máxima y mínima relación acetato/propionato en los animales defaunados alimentados con dietas forrajeras y mixtas respectivamente (2,6 vs. 9,1; $P<0,001$). En relación al metabolismo proteico, los animales alimentados con dietas a base de alfalfa presentaron una mayor ingestión de nitrógeno (21,5 vs. 15,4 g/d, $P<0,01$) y un mayor flujo abomasal de NNA (14,4 vs. 11,1 g/d, $P=0,067$), sin embargo el flujo abomasal de proteína microbiana no se vio afectado por los tratamientos experimentales, aunque éstos sí que modificaron la composición química de los extractos microbianos utilizados como referencia. En términos de eficiencia de síntesis (g/kg MO Realmente Digerida en el Rumen (MORDR)), la ausencia de protozoos no indujo un mejora significativa, mientras que los animales que ingirieron la dieta forrajera mostraron una mayor eficiencia síntesis que aquellos que recibieron una dieta mixta utilizado las bacterias asociadas al líquido (BAL) como extracto de referencia (18,1 vs. 16,3; $P<0,05$). Cuando la eficiencia se refirió a las bacterias asociadas al sólido (BAS) sólo se observó dicho efecto en el grupo control (19,1 vs. 16,3; $P<0,05$).

En conclusión, la ausencia de protozoos redujo la digestibilidad de la ración, sin embargo no mejoró ni la producción microbiana ni su eficiencia de síntesis cuando ésta se determinó utilizando ^{15}N como marcador microbiano.

Tabla 2. Efecto de la defaunación y la dieta sobre el flujo abomasal de nitrógeno microbiano y la eficiencia de síntesis estimada mediante ^{15}N .

	Control		Defaunados		SEM <i>n</i> =5	Significación		
	Alfalfa	Mixta	Alfalfa	Mixta		Prot.	Dieta	PxD
N-Ingerido (g/d)	21,5	16,2	21,6	14,6	2,08	ns	**	ns
Flujo abomasal (g/d)								
NNA	14,6	10,6	14,2	11,5	1,70	ns	T	ns
N-Microb. (BAL)	6,5	6,3	6,3	5,9	0,63	ns	ns	ns
N-Microb. (BAS)	7,0	6,9	6,3	6,6	0,66	ns	ns	ns
Eficiencia de síntesis								
gN/kg MODR								
BAL	21,8	18,3	21,1	20,3	1,17	ns	T	ns
BAS	23,2	19,9	21,2	22,7	1,21	ns	ns	T
gN/kg MORDR								
BAL	18,4	15,5	17,8	17,1	0,85	ns	*	ns
BAS	19,1 ^a	16,3 ^b	17,4 ^{ab}	18,2 ^{ab}	0,84	ns	ns	*

T, P<0,10

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRC, 1993. CAB International, Wallingford. Oxion, U.K.
- Chaney, A.L. & Marbach, E. 1962, *Clinical Chemistry*, 8: p, 130-132
- Jouany, J.P. 1982., *Science Alimentaria*, 2: p, 131-144
- Dehority, B.A. 2003, Rumen Microbiology. *Nottingham University Press, Nottingham, UK*
- Eugène, M., Archimède, H. & Sauvant, D. 2004, *Liv, Prod, Sci*, 85(1): p, 81-97
- Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Zakraoui, F. & Castrillo, C. 1998, *An.F.Sc.Tec*, 71: p, 269-282
- Mayes, R.W., Lamb, C.S. & Colgrove, P.M. 1988, *Proceedings of the 12th General Meeting of the European Grassland Federation, Dublin, Ireland*.
- Williams, A.G. & Coleman, G.S. 1992. The rumen protozoa, Springer-Verlag, New York xii, 441.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el CICYT (AGL 2004-02910/GAN) y el primer autor recibió una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia y agradece a Maricarmen García su colaboración.

EFFECT OF DEFAUNATION AND DIET ON RUMEN FERMENTATION AND MICROBIAL SYNTHESIS

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the effect of rumen protozoa on digestion, rumen fermentation and microbial protein synthesis when lambs received diets with different type of carbohydrates (100% alfalfa vs. 50-50% alfalfa-ground barley grain). Absence of rumen protozoa originated a reduction of 2.0 and 5.1 units in the OM and NDF total tract digestibility and provoked a modification of the rumen fermentation with a drop in the ammonia (120 vs. 40 mg/l; P<0.01) and VFA concentration (122 vs. 83 mM; P<0.01). Defaunation also modified the VFA profile in the rumen showing the highest acetate / propionate ratio when these lambs received forage diet. Abomasal microbial protein flow estimated by ^{15}N was not significantly affected by defaunation. However a reduction of the microbial efficiency of synthesis (g/MOTDR) was observed in lambs receiving concentrate (18.1 vs. 16.3; P<0.05) or when there was a high protozoal concentration in the rumen (19.1 vs. 16.3; P<0.05) using liquid or solid associated bacteria as microbial extract respectively.

Keywords: rumen, microbial protein, synthesis, efficiency.

EFFECTOS DEL MODELO DE TRANSITO Y DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN EL RUMEN SOBRE LAS ESTIMAS IN SITU DE UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE DIFERENTES ALIMENTOS

J. González, R. Mouhbi, J. A. Guevara y J. M. Arroyo
Dpto. Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. Univ. Politécnica de Madrid. 28040 Madrid.
Email: javier.gonzalez@upm.es

INTRODUCCION

Los métodos actuales de valoración proteica para rumiantes se basan usualmente en medidas in situ de la degradabilidad ruminal de los alimentos. Sin embargo, la precisión de estas estimas está condicionada por la fidelidad con que se reproduzca la fisiología digestiva ruminal. En este trabajo se examina en diferentes alimentos el efecto de calcular la fracción by pass (BP) de su materia seca (MS) considerando solo la tasa de salida (k_p) de partículas del rumen (BP_p), como es habitual, o, además, la tasa de conminución (k_c) de estas partículas (BP_{cp}). Para este último caso también se examina el efecto de corregir la contaminación microbiana ocurrida en el rumen sobre estos resultados, así como sobre los de digestibilidad intestinal efectiva (DIE).

MATERIAL Y METODOS

Los alimentos estudiados fueron granos de centeno (GC), maíz (GM) y trigo (GT) salvado de trigo (ST), granos secos de destilería de cebada (GSDC) y de trigo (GSDT), gluten feed (GF), harina de colza (HC), harina de palmiste (HP), pulpa de remolacha deshidratada (PRD), heno de avena (HA) y heno de ray-grass (HRG). En el estudio se usaron tres corderos adultos, fistulizados en rumen y duodeno, alimentados con una ración de HA picado y concentrado comercial granulado en proporción 2:1 en base a MS, distribuida, en seis comidas por día (cada 4 h), a un nivel de 40 g MS/kg $P^{0.75}$. Las tasas k_c y k_p se determinaron en cada cordero para el concentrado y el HA de la dieta marcados con Yb y Eu, respectivamente. Estas determinaciones se realizaron mediante el método de dosis simple y muestreo a nivel de duodeno, ajustándose la evolución de la concentración de marcador al modelo de Dhanoa *et al.* (1985). Los valores correspondientes al concentrado se aplicaron en todos los concentrados y subproductos y los obtenidos en el HA se utilizaron en éste y en el HRG. Para cada alimento se realizaron dos incubaciones en el rumen, utilizando bolsas de nylon (7x11 cm de dimensiones internas y 46 μ m de poro) conteniendo 3 g de muestra fresca (molida a 2 mm). Para los concentrados y subproductos las bolsas se extrajeron del rumen tras tiempos de 2, 4, 8, 16, 24 y 48 h, mientras que para los henos los tiempos fueron 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Durante estos estudios se infundió en el rumen una sal de ^{15}N , aislándose, al final del período experimental, una muestra de bacterias adherentes para corregir la contaminación microbiana de los residuos. Tras extraerse del rumen, las bolsas fueron someramente lavadas con agua corriente y congeladas a -20 °C. Tras su descongelación, se lavaron en una mini-lavadora de turbina (3x5 min). Este mismo proceso se aplicó para obtener el valor a 0 h. Finalmente, las bolsas se liofilizaron y se determinó el contenido en MS del residuo. La evolución en el tiempo de la desaparición de MS se ajustó para cada animal, mediante regresión no lineal, al modelo exponencial de Ørskov y McDonald (1979), estimándose los valores de BP mediante integración matemática de acuerdo con González *et al.* (2006). Para cada cordero se generó una muestra representativa del flujo post-ruminal de alimento no degradado, mezclando los residuos de incubación obtenidos en los distintos tiempos en proporciones predeterminadas según el método propuesto por González *et al.* (2005). Esta muestra se utilizó para determinar la DIE mediante la técnica de bolsas móviles (que se introducían a nivel del duodeno y se recuperaban de las heces) y para corregir la contaminación microbiana producida en el rumen en los valores de BP_{cp} y de su DIE.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las tasas de salida de partículas del rumen fueron similares para el concentrado y el heno: 4,47 vs. 4,25 %·h⁻¹ (ESM = 0,076; *P* = 0,178), detectándose en cambio diferencias para la tasa de conminución: 73,4 vs. 22,4 %·h⁻¹ (ESM = 1,42; *P* = 0,001). Estos valores concuerdan con la observación de Ellis *et al.* (1979) de que las diferencias entre forrajes y concentrados se producen básicamente en *k_c*, al estar compuesta la digesta que abandona el rumen de partículas finas de ambos orígenes concentradas en el retículo. El tiempo de residencia en el rumen asociado a *k_c* representa el 5,73 % y el 15,9 % del tiempo total de residencia para el concentrado y el heno, respectivamente, lo que evidencia su importancia en la estima de la utilización ruminal de ambos tipos de alimentos. Esta observación se confirma al considerar la sobrevaloración de los valores aparentes de BP_p frente a BP_{cp}, que varía del 2,79 % al 16.1 %. Los valores máximos no correspondieron a los henos, como podría pensarse por la mayor incidencia de *k_c* sobre el tiempo total de permanencia en el rumen, sino a los granos de trigo (15,8 %) y centeno, debido a su muy elevada tasa de degradación. Por otra parte, y en líneas generales, este error es inverso a la magnitud de la fracción by pass en los concentrados.

Tabla 1. Efectos de considerar la tasa fraccional de conminución de partículas y la contaminación microbiana en el rumen sobre las estimas de la materia seca by-pass y su digestibilidad intestinal efectiva (DIE) en diferentes alimentos.

	MS by-pass					DIE-MS		
	Ap _p	Ap _{cp}	ESM	Co _{cp}	ESM	Ap _{cp}	Co _{cp}	ESM
GC	10,1	8,70	0,04**	8,4	0,04*	21,4	19,1	0,32*
GM	22,2	20,0	0,05**	19,4	0,11 [†]	69,4	68,4	0,34
GT	9,77	8,44	0,19*	8,2	0,05 [†]	26,6	25,0	0,41
ST	31,4	29,9	0,03***	28,9	0,14*	13,4	11,0	0,50 [†]
GSDC	30,5	29,0	0,05**	28,2	0,06*	20,8	18,9	0,23*
GSDT	29,6	27,9	0,08**	27,0	0,03**	44,8	43,3	0,15*
GF	25,9	24,0	0,07**	23,0	0,02***	14,1	10,7	0,09**
HC	37,8	35,8	0,06**	34,4	0,15*	38,5	36,7	0,22*
HP	66,3	64,5	0,13*	63,2	0,12*	24,8	23,5	0,12*
PRD	42,4	39,8	0,06**	37,8	0,17*	48,6	46,3	0,18*
HA	44,7	41,3	0,06***	38,3	0,51 [†]	5,62	1,12	0,209**
HRG	47,4	42,9	0,12**	40,0	0,35*	8,46	2,79	1,040 [†]

GC, GM y GT: granos de centeno, maíz y trigo. ST: salvado de trigo. GSDC y GSDT: granos secos de destilería de cebada y de trigo. GF: gluten feed. HC: harina de colza. HP: harina de palmiste. PRD: pulpa de remolacha deshidratada. HA y HGR: henos de avena y de ray-grass. Ap: aparente. Co: corregido. [†] (*P*<0,1); * (*P*<0,05); ** (*P*<0,01); *** (*P*<0,001)

La consideración adicional de la contaminación microbiana producida durante la incubación ruminal aumenta marcadamente este error. Así, los valores aparentes de BP_p sobrevaloran los corregidos de BP_{cp} entre 4,9 y 20,2 %. Los valores máximos también correspondieron a los granos de trigo (19,1 %) y centeno, si bien, en este caso, los henos también presentaron altos valores: 16,7 % en HA y 18,5 % en HRG. Estos resultados concuerdan en general con las observaciones de Rodríguez y González (2006) que indican que la contaminación microbiana, y por tanto los errores que conlleva, están principalmente asociados negativamente con el contenido en lignina y positivamente con el contenido en fibra, especialmente en celulosa.

La contaminación microbiana ruminal afecta también los valores de DIE, al desaparecer las bacterias prácticamente de la bolsa con su digestión en el intestino. Así, los valores aparentes de DIE sobrevaloran los corregidos entre 1,5 y 31,8 % en los concentrados y subproductos y en valores tan elevados como 203 % y 402 % en HRG y HA, respectivamente (Tabla 1). Esta sobrevaloración incrementa las ya indicadas. Consecuentemente, resulta de interés la consideración de los efectos tanto de *k_c* como de la

contaminación microbiana ruminal para una valoración mas correcta de todo tipo de alimentos mediante métodos *in situ*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dhanoa, M.S., Siddons, R.C., France, J. Gale, L., 1985. A multicompartmental model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Brit. J. Nutr.* 53, 663-671.
- Ellis, W, Matis, J.H., Lascano, C., 1979. Quantitating ruminal turnover. *Fed. Proc.* 38, 2702-2706.
- González J., Ouarti M., Alvir M.R., Rodríguez C.A., 2005. Propuesta de un método *in situ* simplificado para la evaluación proteica de los alimentos en rumiantes. *ITEA Vol. Extra 25*, 581-583.
- González, J., Ouarti, M., Rodríguez, C.A., M.R. Alvir. 2006. Effects of considering the rate of comminution of particles and microbial contamination on the accuracy of *in situ* studies of feed protein degradability in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125, 89-98.
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage, *J. Agric. Sci. Camb.* 92, 499-503.
- Rodríguez, C.A., González, J., 2006. *In situ* study of the relevance of bacterial adherence to feed particles on the contamination and accuracy of rumen degradability estimates of feeds of vegetable origin. *Br. J. Nutr.* 96, 316-325.

EFFECTS OF THE TRANSIT MODEL AND OF MICROBIAL CONTAMINATION IN THE RUMEN ON THE ACCURACY OF *IN SITU* DIGESTIVE AVAILABILITY IN DIFFERENT FEEDS

ABSTRACT: Not considering the rate of particle comminution in the rumen and the lack of correction of the microbial contamination during ruminal incubations led to consistent over-evaluations of the by pass fraction of feed DM. When both factors were combined this over-evaluation ranged from 4.9 to 20.2 % in 12 different feeds (concentrates, by-products and grass hays). The lack of correction of the microbial contamination in the rumen is also associated with over-evaluations of the *in situ* intestinal digestibility estimates, due to the digestion of microbes in the intestine, which enlarged the previous errors. This over-evaluation ranged from 1.5 to 31.8 % in concentrates and by-products and reached very high values in hays, which had a very low intestinal digestibility. Therefore, both factors should be considered for a better accuracy of *in situ* estimates.

Keywords: *In situ* feed availability; Rumen outflow rate; Particle comminution rate; Microbial contamination.

EFFECTOS DEL USO DE SULFITO SÓDICO PARA ESTIMAR EL CONTENIDO Y DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LA FIBRA NEUTRO DETERGENTE Y SU N ASOCIADO EN DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTOS

J. A. Guevara, J. González, R. Mouhbi, J. M. Arroyo y M.R. Alvir

Dpto. Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. Univ. Politécnica de Madrid. 28040 Madrid.

Email: javier.gonzalez@upm.es

INTRODUCCION

El sulfito sódico se usa de forma opcional para disminuir la contaminación proteica del residuo de fibra neutro detergente (FND). Los compuestos nitrogenados de éste pueden ser constituyentes de la pared celular, como el N de la lignina o las proteínas integrantes de ésta, o proteínas insolubles no asociadas a la pared celular. Esta última fracción puede ser elevada, especialmente en materias primas sometidas a tratamientos térmicos en condiciones de alta humedad. En este trabajo se examina en diferentes alimentos el uso del sulfito sódico sobre las estimas de N insoluble en solución neutro detergente (NDIN) y FND, así como de su degradabilidad en el rumen.

MATERIAL Y METODOS

Los alimentos estudiados fueron salvado de trigo (ST), granos secos de destilería de trigo (GSDT), harina de colza (HC), harina de palmiste (HP), pulpa de remolacha deshidratada (PRD), heno de avena (HA) y heno de ray-grass (HRG). En ellos se determinó el contenido en FND y NDIN, así como la degradabilidad efectiva (DE) ruminal de ambos parámetros, mediante métodos in situ. La FND se determinó en alimentos y residuos de incubación usando α -amilasa, incluyendo o no sulfito sódico (Van Soest et al., 1991), incorporando los resultados las cenizas residuales. El NDIN se determinó analizando para N (método Dumas) el residuo de FND, expresándose los resultados como porcentaje del N total. También se determinó la contribución de la proteína bruta equivalente (NDIN x 6,25) a la FND.

En los estudios in situ se usaron tres corderos adultos, fistulizados en rumen y duodeno, alimentados con una ración de HA picado y concentrado comercial granulado en proporción 2:1 en base a MS, distribuida, en seis comidas por día (cada 4 h), a un nivel de 40 g MS/kg P^{0,75}. Para cada alimento se realizaron dos incubaciones en el rumen, utilizando bolsas de nylon (7x11 cm de dimensiones internas y 46 μ m de poro) conteniendo 3 g de muestra fresca (molida a 2 mm). Para los concentrados y subproductos las bolsas se extrajeron del rumen tras tiempos de 2, 4, 8, 16, 24 y 48 h, mientras que para los henos los tiempos fueron 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Las bolsas, tras extraerse del rumen, fueron someramente lavadas con agua corriente y congeladas a -20 °C. Tras su descongelación, se lavaron en una mini-lavadora de turbina (3x5 min.). Este mismo proceso se aplicó para obtener el valor a 0 h. Finalmente, las bolsas se liofilizaron determinándose el contenido en MS del residuo. La evolución en el tiempo de la desaparición de MS se ajustó para cada animal, mediante regresión no lineal, al modelo exponencial de Ørskov y McDonald (1979), estimándose los valores de DE mediante integración matemática considerando las tasas de conminución (k_c) y salida (k_p) de partículas del rumen de acuerdo con González *et al.* (2006). Estas tasas se determinaron en cada cordero para el concentrado y el HA de la dieta marcados con Yb y Eu, respectivamente. Los valores correspondientes al concentrado se emplearon para todos los concentrados y subproductos, mientras que los obtenidos en el HA se utilizaron en éste y en el HRG. Estas determinaciones se realizaron mediante el método de dosis simple y muestreo a nivel del duodeno, ajustándose la evolución de la concentración de marcador al modelo de Dhanoa *et al.* (1985). Finalmente, se generó para cada cordero una muestra representativa del flujo post-ruminal de alimento no degradado, mezclando los residuos de incubación obtenidos en los distintos tiempos en proporciones predeterminadas según el método propuesto por González *et al.* (2005). Las muestras así obtenidas fueron analizadas

para MS, FND y NDIN. Los valores de DE de FND y NDIN se calcularon a partir de sus concentraciones (expresadas sobre la MS) en la muestra compuesta (X) y en el alimento (Y) y del valor de DE de la MS, obtenido por integración matemática: $DE = 1 - [X (1 - DEMS)/Y]$ (González *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSION

La proporción de NDIN varió ampliamente entre alimentos (Tabla 1). El uso del sulfito redujo ($P < 0,001$) esta proporción en GSDT, HC y HA y la incrementó, en cambio, en ST ($P < 0,01$) y PRD ($P < 0,001$). Todos estos cambios se asociaron con variaciones significativas del mismo signo en la contribución de PB a la FND. Sin embargo, los cambios de NDIN no siempre se tradujeron en variaciones en el mismo sentido del valor de FND. Así, este valor se redujo en GSDT ($P < 0,001$), no varió en HC e incluso aumentó en HA ($P < 0,001$). El incremento de NDIN se asocio con reducciones de FND en ST ($P < 0,05$) y PRD ($P < 0,001$). Igualmente se redujo ($P < 0,01$) el contenido en FND al usar sulfito en HP y HRG, para los que no se apreciaron variaciones en la proporción de NDIN.

Tabla 1. Efectos del uso de sulfito sódico sobre las estimas de N insoluble en solución neutro detergente (NDIN), fibra neutro detergente (FND) y contribución de la proteína bruta (NDIN x 6.25) a la FND (PB/FND) de diferentes alimentos.

	NDIN (% del N total)				FND (% de la MS)				PB/FND (% de la FND)			
	SS	CS	ESM	P	SS	CS	ESM	P	SS	CS	ESM	P
ST	26,5	29,5	0,32	0,001	41,1	40,1	0,20	0,011	8,91	10,2	0,108	<0,001
GSDT	42,6	16,0	0,51	<,001	45,4	33,9	0,63	<0,001	32,5	16,3	0,44	<0,001
HC	23,9	16,0	0,46	<0,001	33,8	33,0	0,45	0,278	24,4	16,8	0,48	<0,001
HP	75,6	74,9	1,40	0,722	65,1	60,7	0,79	0,007	16,3	17,3	0,31	0,083
PRD	36,5	47,0	0,73	<0,001	47,4	43,1	0,23	<0,001	7,63	10,8	0,165	<0,001
HA	18,8	10,4	1,09	0,002	53,6	55,3	0,19	<0,001	4,53	2,42	0,262	0,002
HRG	26,0	26,6	0,98	0,698	59,0	57,2	0,26	0,002	5,04	5,31	0,196	0,382

SS: sin sulfito. CS: con sulfito. ST: salvado de trigo. GSDT: granos secos de destilería de de trigo. HC: harina de colza. HP: harina de palmiste. PRD: pulpa de remolacha deshidratada. HA: heno de avena. HGR: heno de ray-grass.

El uso de sulfito sódico en el análisis de FND permite romper los puentes di-sulfuro y solubilizar así muchas proteínas condensadas con otros compuestos, lo que reduce la contaminación proteica de la FND (Van Soest *et al.*, 1991). Nuestros resultados si bien confirman este efecto en algunos alimentos (en especial resultantes de procesos térmicos), también indican que el tratamiento puede no ser efectivo en otros, que como la HP contienen una alta proporción de proteínas insolubles, o incluso puede producir el efecto contrario al perseguido (ST y PRD) al insolubilizar proteínas. Además, el sulfito ataca la lignina, reduciendo su recuperación en la FND (Van Soest *et al.*, 1991); así, el efecto sobre la FND es la resultante de estos procesos, lo puede justificar gran parte de las inconsistencias observadas.

En general el uso del sulfito se asoció con variaciones de la DE del NDIN de sentido opuesto a las inducidas en la estima de su proporción sobre el N del alimento (Tabla 2). Así, se redujo ($P < 0,01$) en GSDT, HC y HA y se incrementó en PRD ($P < 0,001$). Las excepciones al comportamiento descrito fueron el ST, si bien éste presentó un aumento numérico (10,7%), y el HRG, cuya DE aumento ($P < 0,05$) sin efecto previo del uso del sulfito en la estima de NDIN. Las proteínas insolubles no integradas en la pared celular deben tener una DE superior a la de los compuestos nitrogenados constituyentes de ésta, lo que permite justificar la variación inversa entre el valor de NDIN y su DE al usar sulfito. La DE de la FND se redujo ($P < 0,05$) en GSDT y HP y aumentó en HA ($P < 0,01$) y HRG ($P < 0,05$). Como ya se indicó el sulfito ejerce efectos de magnitud variable al menos sobre la proteína y la lignina de este residuo, dependiendo la resultante de la intensidad y sentido de cada uno de ellos. A este respecto conviene señalar que las pérdidas de lignina al usar sulfito deben ser mayores

en los residuos de incubación ruminal que en el alimento (al concentrarse la lignina por la degradación), lo que implicaría un aumento en la DE de la FND, como se observa en los henos.

Tabla 2. Efectos del uso de sulfito sódico sobre la degradabilidad efectiva (DE) del N insoluble en solución neutro detergente (NDIN) y la fibra neutro detergente (FND) de diferentes alimentos.

	DE del NDIN (%)				DE de la FND (%)			
	SS	CS	ESM	P	SS	CS	ESM	P
ST	67,5	74,7	2,08	0,134	42,0	41,1	0,50	0,325
GSDT	81,9	72,2	0,67	0,009	62,6	55,1	0,66	0,015
HC	47,4	38,9	0,40	0,004	40,5	39,7	0,71	0,525
HP	65,6	68,4	1,46	0,308	52,4	50,1	0,19	0,013
PRD	11,6	44,4	0,63	<0,001	51,5	52,4	0,32	0,198
HA	47,9	8,61	1,362	0,002	34,3	38,3	0,12	0,002
HRG	31,1	36,5	0,40	0,011	40,2	41,9	0,25	0,040

Abreviaturas como en Tabla 1.

El diferente comportamiento observado entre alimentos muestra que la interpretación de los resultados obtenidos con el uso de sulfito debe realizarse con precaución, siendo necesarios estudios de caracterización del mismo para mejorar la utilidad y precisión de esta técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dhanoa, M.S., Siddons, R.C., France, J. Gale, L., 1985. A multicompartmental model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Brit. J. Nutr.* 53, 663-671.
- González J., Ouarti M., Alvir M.R., Rodríguez C.A., 2005. Propuesta de un método *in situ* simplificado para la evaluación proteica de los alimentos en rumiantes. *ITEA Vol. Extra 25*, 581-583.
- González, J., Ouarti, M., Rodríguez, C.A., M.R. Alvir. 2006. Effects of considering the rate of comminution of particles and microbial contamination on the accuracy of *in situ* studies of feed protein degradability in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125, 89-98.
- Ørskov E.R., McDonald I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage, *J. Agric. Sci. Camb.* 92, 499-503.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.

USE OF SODIUM SULPHITE TO ESTIMATE NEUTRAL DETERGENT FIBRE (NDF), ITS ASSOCIATED INSOLUBLE PROTEIN AND THEIR RUMINAL DEGRADABILITY OF FEEDS

ABSTRACT: Chemical analysis show that to use sodium sulphite is of interest to reduce protein contamination of NDF in some feeds, but in other might have even the opposite effect. Changes in the neutral detergent insoluble-N (NDIN) due to the sulphite use were associated with variations in the same way in the effective degradability of NDIN. Effective degradability of NDF may be also affected by the use of sulphite. Therefore, caution should be done in the interpretation of results obtained using sodium sulphite.

Keywords: Sodium sulphite use, Neutral detergent fibre, Insoluble N in neutral detergent solution, Fibre degradability.

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UN HIDROLIZADO DE LEVADURA SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE DOS DIETAS

C. Saro¹, M. Pérez², M.E. Martínez¹, S. Ramos¹, M.L. Tejido¹, M.J. Ranilla¹ y M.D. Carro¹

¹Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León, España

²Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Autopista a Varadero, km 3½, Matanzas, Cuba

mjrang@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Las levaduras del género *Saccharomyces* constituyen unos de los microorganismos más utilizados en alimentación animal. En el caso de los animales rumiantes, diversos estudios realizados con levaduras viables de este género han obtenido efectos positivos sobre la salud y la productividad, relacionados en su mayoría con una modificación de la fermentación ruminal (Carro et al., 1992a; Koul et al., 1998). Sin embargo, la magnitud de estos efectos es variable y parece depender de la composición de la dieta que reciben los animales. Por otra parte, existe información limitada acerca de los efectos sobre la fermentación ruminal de levaduras inactivadas, utilizadas posiblemente como prebióticos. En este trabajo se analizó el efecto de la adición de un hidrolizado de *S. cerevisiae* procedente de la industria alcohólica sobre la fermentación ruminal *in vitro* de dos dietas de diferente composición. Estos hidrolizados se obtienen a partir de residuos altamente contaminantes, por lo que su empleo permitiría disponer de un producto de bajo coste y con beneficios medioambientales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando un sistema de cultivos discontinuos de microorganismos ruminales. Como sustrato de incubación se utilizaron dos dietas: una representativa de las empleadas en el cebo de corderos (15% paja y 85 % concentrado) y otra para ovejas lecheras (50% heno de alfalfa y 50% concentrado). La composición química de ambas dietas se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química (g/kg MS) de las dietas experimentales

Dieta	Materia orgánica	Proteína bruta	Fibra neutro-Detergente	Fibra ácido-detergente
Cebo	942	145	427	95,2
Leche	935	186	454	188

Para la incubación se utilizaron botellas de vidrio de 120 ml de capacidad y en el interior de cada una se pesaron 300 mg de materia seca (MS) de la dieta correspondiente. Se utilizaron 100 µl del hidrolizado de levaduras (LEV). Como tratamiento control se incubaron botellas que contenían sustrato pero sin adición de hidrolizado de levaduras (CON). Cada botella se llenó con 30 ml de una mezcla 1:4 (vol:vol) del medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970) y de fluido ruminal. El fluido ruminal se obtuvo de 4 ovejas fistuladas, que eran alimentadas las mismas dietas que fueron incubadas en cada bote (2 ovejas con cada dieta). La dosificación de la mezcla en las botellas se realizó en condiciones de anaerobiosis y manteniendo una temperatura de 39°C. Tras la dosificación, las botellas se cerraron herméticamente con un tapón de caucho y cápsulas de aluminio y se colocaron en un incubador a 39°C. Una vez transcurridas 16 horas de incubación, se midió la cantidad de gas producido en cada botella y se tomó una muestra para determinar su concentración en metano. Las botellas se abrieron, se midió el pH de su contenido y se tomaron muestras para analizar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco.

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza, en el que los factores analizados fueron el tipo de dieta, la adición de hidrolizado y la interacción de ambos factores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 2, la dieta incubada afectó significativamente ($P<0,05$) a todos los parámetros de fermentación estudiados, con la excepción del metano producido ($P=0,299$). Para la dieta cebo, la adición del hidrolizado de levaduras aumentó ($P=0,05$) la producción de AGV totales y de butírico, mostrando el acético una tendencia ($P=0,069$) en el mismo sentido. Para la dieta leche, sin embargo, la producción de AGV no se vio modificada por el hidrolizado, salvo una tendencia ($P=0,075$) a disminuir el propiónico, lo que se tradujo en un aumento significativo ($P<0,0001$) de la relación acético/propiónico.

Tabla 2. Efecto de adición de un hidrolizado de levadura sobre los principales parámetros de fermentación ruminal *in vitro* de dos dietas, cebo y leche ($n = 4$)

	Dieta cebo		Dieta leche		EEM ²	P=		
	CON	LEV ¹	CON	LEV		DIETA	TRAT	DIETAxTRAT
AGV (μmol)								
Total	2196 ^a	2383 ^b	2068	2066	62,3	0,004	0,163	0,154
Acético	1152	1243 [†]	1302	1368	32,4	0,001	0,031	0,712
Propiónico	680	722	444	372 [†]	26,2	0,001	0,581	0,049
Butírico	307 ^a	343 ^b	220	216	10,7	0,001	0,152	0,089
Otros	57,5	74,3	102,6	109,4	6,75	0,001	0,104	0,471
Acético/Propiónico	1,70	1,72	2,93 ^a	3,68 ^b	0,048	0,001	0,001	0,001
Metano (μmol)	336	354	374	365	23,1	0,299	0,853	0,581
Gas (μmol)	7534 ^a	7779 ^b	7466	7477	10,6	0,023	0,095	0,124
NH ₃ (mg/l)	72,2 ^a	125,5 ^b	224,5	205,8	10,79	0,001	0,136	0,006
pH	6,44	6,41	6,63	6,62	0,039	0,001	0,593	0,776

^{a, b} dentro de cada fila, los valores con diferente superíndice difieren ($P<0,05$); [†]: $P<0,10$

¹ CON: control; LEV: hidrolizado de levadura

² error estándar de la media

El hidrolizado de levadura aumentó la producción de gas ($P=0,0308$) y la concentración de amoníaco ($P=0,0045$) con la ración cebo, sin que se observaran diferencias entre el control y el tratamiento en el caso de la dieta leche ($P=0,9133$ y $0,2428$, respectivamente). La producción de metano y el pH final no se vieron afectados ($P=0,0853$ y $0,593$, respectivamente) por la adición de levaduras con ninguna de las dos dietas.

Los resultados obtenidos indican que, a la dosis empleada en el presente estudio, el extracto de levadura estimuló la fermentación ruminal *in vitro* con la dieta cebo, con una alta proporción de concentrado, pero no tuvo efectos cuando se utilizó la dieta leche. Estas diferencias entre dietas están en línea con los resultados obtenidos con levaduras vivas en diversos estudios que sugieren un mayor efecto de estos aditivos cuando se emplean raciones con alto contenido en concentrados y bajo contenido en fibra (Carro et al., 1992b; Fiems et al., 1993). Es necesario profundizar en el potencial uso de estos hidrolizados de levaduras como modificadores de la fermentación ruminal, mediante estudios con dietas de diferente composición, para establecer las condiciones óptimas y las dosis más efectivas del producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carro, M.D., Lebzien, P., Rohr, K. 1992a. Livest. Prod. Sci. 32: 219-229.
- Carro, M.D., Lebzien, P., Rohr, K. 1992b. Anim. Feed Sci. Technol. 37: 209-220.
- Fiems, L.J., Cottyn, B.G., Dussert, L., Vanacker, J.M. 1993. Reprod Nutr Dev 1993;33:43-49.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J. 1970. Agric. Handbook n. 379. Agric. Res. Serv., USDA. Washington DC
- Koul, V., Kumar, U., Sareen V.K., Singh, S. 1998. J. Sci. Food Agric. 77:407-413

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto PCI-Iberoamérica A/4951/06 financiado por MAE-AECI.

EFFECT OF THE ADDITION OF A YEAST HYDROLYSATE ON IN VITRO RUMEN FERMENTATION OF TWO DIETS

ABSTRACT: Batch cultures of mixed rumen microorganisms were used to study the effects of a yeast hydrolysate from *S. cerevisiae* (LEV) on the in vitro fermentation of two sheep diets (milk and fattening). In 16 h incubations, LEV increased ($P<0.05$) total VFA and butyric production, and tended ($P<0.10$) to increase acetic production for fattening diet. For milk diet, LEV tended ($P<0.10$) to decrease propionic production, and significantly increased ($P<0.05$) the acetic/propionic ratio. Gas production and ammonia concentration were increased ($P<0.05$) by LEV for the fattening diet. Methane production and pH were unaffected by LEV treatment. The results show that LEV stimulated in vitro ruminal fermentation when a high concentrate diet (fattening) was incubated, but no effects were detected for a more fibrous (milk) diet.

Keywords: *Yeast, rumen, fermentation, prebiotic*

TÉCNICA DE VISIÓN ARTIFICIAL PARA ESTIMAR EL ÁREA DE LAS PAPILAS Y LA SUPERFICIE DE LA MUCOSA RUMINAL

M. Devant,^{*1,2} M. Nofrarías³ y A. Bach^{1,2,4}

¹ Grupo de Alimentación, Manejo y Bienestar Animal, Barcelona, Spain.

² IRTA-Torre Marimon, Caldes de Montbui, Spain. maria.devant@irta.cat

³ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Bellaterra, Barcelona, Spain.

⁴ ICREA, Barcelona, Spain.

INTRODUCCIÓN

El área y la superficie de la mucosa ruminal se han estudiado en numerosos trabajos, en vacas (Zitnan et al., 2003; Reynolds et al., 2004) y en terneros tras el destete (Lesmeister et al., 2004a; Suárez et al., 2006). La mayoría de metodologías utilizadas para estudiar la morfología ruminal se basan en técnicas histológicas para determinar la longitud (LP) y el ancho (AP) de la papila, y en algunos casos (Zitnan et al., 2003; Hill et al., 2005) se realiza microscopía electrónica adicional para estimar el número de papilas ruminales (NP). Los principales problemas de estas metodologías son que requieren mucho tiempo y son costosas, y se usa un número bajo de papilas para estimar dichos datos (aproximadamente 10 papilas bien orientadas por muestra). Existen estudios donde se evalúan las técnicas de disección (Hill et al., 2005), y las zonas de muestreo (Lesmeister et al., 2004b). Reynolds et al. (2004) diseccionaron las papilas del epitelio ruminal de una muestra ruminal de 2.54 x 2.54 cm, las fotografiaron en un cuadrícula y utilizaron una foto digital para estimar la LP, AP, el área de la papila (ARP) y el NP. Sin embargo, sus datos estimados a través de una fotografía digital no se contrastaron los datos obtenidos por métodos histológicos. El objetivo del presente estudio fue comparar el ARP obtenido a través de una metodología de visión artificial con el ARP estimado a través de una metodología histológica en muestras ruminales tomadas de terneros cebados con elevadas cantidades de concentrado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Treinta terneros Holstein alimentados con concentrado (50% maíz, 16% cascarilla de soja, 9,0% cebada, 7,0% segundas, 7,0% torta de soja, 5,8% corn gluten feed, 2,8% aceite de palma, 1,2% carbonato cálcico, 0,6% sal, 0,4% fosfato dicálcico, 0,2% premix vitamínico-mineral; 14,4% PB, 6,1% EE, 24,7% FND, y 6,4% cenizas; sobre MS) y paja *ad libitum* durante 98 días. Se sacrificaron con un PV final de $505 \pm 5,9$ kg. Inmediatamente después del sacrificio, se tomaron muestras de la zona caudal del saco ventral del rumen, se lavaron con una solución 0,9% de NaCl, y se conservaron en formol tamponado al 10% hasta su posterior análisis con una metodología de visión artificial o histológica. Para la evaluación de la morfología de las papilas ruminales con la metodología de visión artificial se seccionaron una a una cada papila con unas tijeras Metzemaum de una submuestra de pared ruminal de 3,4 x 3,4 cm y se transfirieron a una superficie negra con una escala graduada, tras seccionar todas las papilas se tomo una fotografía digital. Las fotografías se analizaron mediante visión artificial utilizando el programa Carnoy 2.1 para MacOS X (2001) y se estimaron el NP por cm^2 , la media y el coeficiente de variación del ARP (mm^2) y se calculó el área de la superficie de la mucosa (mm^2/cm^2) multiplicando el NP con la media del ARP. Para el análisis de la morfología papilar con la metodología histológica las muestras se deshidrataron y incluyeron parafina, se seccionaron a $4 \mu\text{m}$ y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las medidas morfométricas se realizaron con un microscopio óptico (BHS, Olympus, Barcelona, España) usando una lente ocular con micrómetro lineal (Olympus, Barcelona, España). La LP y el AP se midieron en 10 papilas bien orientadas; todas las medidas morfométricas las realizó una misma persona. Se obtuvo la media y el coeficiente de variación de la LP y del AP y la media de la LP y del AP se utilizaron para calcular el ARP con la fórmula propuesta por Hill et al. (2005). Se realizó una regresión lineal (JMP, versión 5.0.1 para MacOS X, 2001, Cary, NC) entre el ARP obtenido por visión digital y el ARP

calculado según la fórmula de Hill et al. (2005) con los valores obtenidos de la metodología histológica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

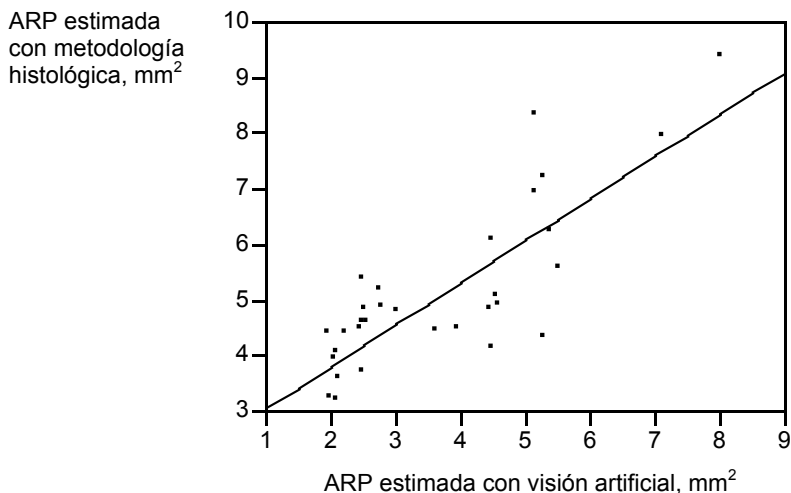
El coeficiente de variación del ARP obtenido con la metodología de visión artificial ($98,4 \pm 61,51$ %) fue superior a los coeficientes de variación de la LP y el AP determinados histológicamente ($15,2 \pm 5,43$ % y $21,2 \pm 11,98$ %, respectivamente) y usados para estimar el ARP. Reynolds et al. (2004) también observaron en vacas de transición una gran variación en el tamaño de las papilas ruminales estimadas a través de una metodología de visión artificial. Las papilas que se analizan a través de la metodología histológica son papilas anatómicamente muy cercanas, ello puede contribuir al bajo coeficiente de variación de la LP y el AP observados con dicha técnica. Diferentes autores (Lesmeister et al., 2004b; Reynolds et al., 2004) han sugerido que las medidas morfológicas de las papilas no deberían medirse en un número bajo de papilas y de animales. A pesar de ello, en el presente estudio la correlación entre el ARP estimado con la técnica de visión artificial y el ARP estimado a partir de la metodología histológica fue elevado ($R^2 = 68\%$; $P < 0,001$; Figura 1).

Los valores de ARP obtenidos con la técnica de visión artificial se correlacionan bien con los valores de ARP estimados a partir de la metodología histológica. Además, a través de la técnica de visión artificial se obtienen simultáneamente el NP y el ARP. Finalmente, la técnica de visión artificial es fácil de realizar y rápida, permite analizar un elevado número de muestras en poco tiempo. Por todo ello se propone la técnica de visión artificial para estudiar el NP y el ARP para evaluar un gran número de muestras y mejorar así la representatividad de los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- Carnoy for MacOS X., version 2.1. 2001. Laboratory of Plant Systematics. Katholieke Universiteit Leuven. Belgium.
- JMP. 2002. JMP. The Statistics Discovery Software SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Hill, S. R., B. A. Hopkins, S. Davidson, S. M. Bolt, D. E. Diaz, C. Brownie, T. Brown, G. B. Hungtington, L. W. Whitlow. 2005. J. Dairy Sci. 88: 324-326.
- Lesmeister, K. E., P. R. Tozer, A. J. Heinrichs. 2004b. J. Dairy Sci. 87: 1336-1344.
- Lesmeister, K. E., A. J. Heinrichs, M. T. Gabler. 2004a. J. Dairy Sci. 87: 1832-1839.
- Reynolds, C. K., B. Dürst., B. Lupoli, D. J. Humphries, D. E. Beever. 2004. J. Dairy Sci. 87: 961-971.
- Suárez, B. J., C. G. Van Reenen, W. J. J. Gerrits, N. Stockhofe, A. M. van Vuuren, J. Dijkstra. 2006. J. Dairy Sci. 89: 4376-4386.
- Zitnan, R., S. Kuhla, K. Nürenberg, U. Schönhusen, Z. Ceresnakova, A. Sommer, M. Baran, G. Greserova, J. Voigt. 2003. Vet. Med. Czech. 48: 177-182.

Figura 1. Relación entre el área media de las papilas ruminales (ARP, mm²) obtenida mediante visión digital y el área media de las papilas ruminales (ARP, mm²) obtenida con la metodología histológica (R² = 68%, P < 0,001).



DIGITAL VISION TECHNIQUE TO ESTIMATE RUMEN PAPILLAE AND MUCOSA SURFACE AREA

ABSTRACT

The objective of this study was to compare mean papillae surface areas obtained using a digital vision technique or using histological analyses in rumen wall samples of finishing bulls fed high-concentrate diets. Thirty Holstein bulls fed concentrate and straw ad libitum during 98 days were slaughtered at a final BW of 505 ± 5.9 kg. Immediately following sacrifice, ventral rumen wall samples from the caudal sac were collected to conduct a digital vision technique and histological analysis. A 3.4 x 3.4 cm rumen section was analyzed by digital vision technique for total papillae number per cm², and mean and coefficient of variation of papillae surface area (PSA). In addition, ten well-orientated papillae were analyzed using a histological method. Mean and coefficient of variation of papillae length and width were recorded, and these values were used to estimate PSA. The correlation between PSA values obtained with the digital technique and those obtained from the histological analyses was high (R² = 68%; P < 0.001). The digital technique provides simultaneously the papillae number and PSA values, and due to its simplicity, it may allow the analysis of a large number of samples.

Keywords: digital vision, morphology, rumen papillae, ruminant

DESARROLLO DE UN MODELO ANIMAL PARA EVALUAR LAS PREFERENCIAS ORO-SENSORIALES EN TERNERAS DESTETADAS Y SU APLICACIÓN PARA DETERMINAR PREFERENCIAS ENTRE INGREDIENTES ENERGÉTICOS

C. Montoro¹, F. Boe¹, I. Ipharraguerre², A. Bach^{1,3}

¹Grupo de Alimentación, Manejo y Bienestar Animal, IRTA – Unitat de Remugants, 08140 Barcelona. *carlos.montoro@irta.es

²LUCTA S.A., 08170 Barcelona

³ICREA (Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats), 08010 Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Durante el periodo de destete se producen cambios importantes en la maduración fisiológica y metabólica de la ternera (Rumbo y Schiffrin, 2005; Ishihara et al., 2001). A este factor se le añaden la restricción del consumo de leche y el miedo o rechazo hacia el nuevo alimento, definido como neofobia (Herskin y Munksgaard, 2000), lo que produce una disminución de la ingestión provocando una reducción en el ritmo de crecimiento (Terré et al., 2006). Con el presente estudio se pretende iniciar una línea de investigación enfocada a establecer estrategias para incrementar el consumo de alimento sólido durante este periodo. Los objetivos de este estudio fueron desarrollar un modelo animal que permita establecer las preferencias oro-sensoriales de estos animales y establecer sus preferencias entre ocho ingredientes energéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de desarrollar un modelo animal para el estudio de preferencias oro-sensoriales en terneras se realizaron tres ensayos. En primer lugar, para definir la pauta de ingestión de las terneras a lo largo del día se realizó un ensayo con 35 animales ($65 \pm 0,7$ d de edad), cuya ingestión se monitorizó durante 24 h cada 60 min. Una vez estudiado el momento óptimo para llevar a cabo pruebas de preferencia oro-sensoriales se planteó el procedimiento para efectuarlas que consistió en ofrecer dos alimentos distintos a cada animal y registrar su consumo cada 30 min durante 6 h. Así, en un ensayo se testó la preferencia con ingredientes conocidos (para minimizar el efecto neofóbico) en 30 terneras ($65 \pm 0,7$ d de edad). Para ello se ofreció el concentrado habitual de la explotación en dos cubos, en uno de los cuales se adicionó un 10% de azúcar. Finalmente, para evaluar el procedimiento con ingredientes nuevos para el animal, se ofreció maíz y cebada a otras 30 terneras *naive* ($65 \pm 0,9$ d de edad) siguiendo el mismo procedimiento de monitorización del consumo.

Una vez el modelo animal fue desarrollado, se escogieron ocho ingredientes energéticos: arroz, avena, cebada, corn gluten feed, maíz, sorgo, tercerillas y trigo, y se realizaron 28 pruebas para comparar las preferencias mostradas por las terneras hacia estos ingredientes. En todas las pruebas participaron 20 animales. Cada grupo se utilizó dos veces para realizar las pruebas, el día 3 y el día 5 post-destete. Los animales no repitieron ingredientes en ninguna de las dos pruebas en las que participaron.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el patrón de ingestión de las terneras destetadas. Se observó que los animales concentran su ingestión en dos periodos de tiempo correspondientes a las horas en las que se les ofrecía la leche anteriormente. Esta distribución de la ingestión se corresponde con el comportamiento estudiado por Ray y Roubicek (1971). Analizando este patrón de conducta, se escogieron las horas comprendidas entre las 0800 y las 1400 para realizar las pruebas de preferencia oro-sensorial. Durante este periodo de tiempo, se evitan animales hambrientos que tienen menor capacidad de discernir en función de su percepción sensorial, debido a que buscan saciarse con mayor rapidez. Además, en este intervalo se obtiene un nivel de consumo alrededor de 125 g/h adecuado para realizar tests de preferencia.

En el segundo ensayo, los resultados de ingestión media cada 30 min a lo largo de 6 h indicaron una preferencia por el concentrado con 10% de azúcar ($P < 0,001$) respecto al concentrado sin azúcar. Estos resultados coinciden con estudios anteriores realizados en vacas lecheras (Goatcher y Church, 1970; Nombekela y Murphy, 1995). En el tercer ensayo, cuando se usaron ingredientes desconocidos o nuevos para las terneras, se registraron consumos bastante inferiores a los obtenidos en la prueba con azúcar. Esta disminución probablemente fue debida a la neofobia. De todas formas, el modelo permitió establecer diferencias de preferencia entre el maíz y la cebada pudiéndose detectar diferencias significativas ($P < 0,05$) favorables a la cebada. Se realizaron diversos análisis de los datos, y se apreció que eliminando 10 animales al azar de la prueba, se mantenían las diferencias significativas. También se observó que si en lugar de realizar los registros cada 30 min, se hiciese cada hora se obtenía una tendencia pero los resultados no alcanzaban la significación estadística. Por este motivo se definió el modelo animal como un ensayo usando un mínimo de 20 animales con un período de 6 h que debería iniciarse a las 0800, durante el cual se debería medir el consumo de los dos ingredientes estudiados cada 30 min.

Los resultados de las 28 pruebas realizadas con este modelo animal se muestran en la Tabla 1. El trigo fue el ingrediente preferido al resultar significativamente más apetecible que el resto en seis de las siete pruebas ($P < 0,05$) realizadas. Por el contrario, el ingrediente de menor apetencia fue el corn gluten feed, que resultó significativamente ($P < 0,05$) menos preferido que el resto en todas las pruebas excepto en una.

El orden de preferencia de las terneras por los ingredientes testados en función del número de pruebas en las que habían sido preferidos significativamente fue: trigo (en 6 pruebas) > sorgo (5) > maíz (4) = cebada (4) > tercerillas (3) > avena (1) = arroz (1) > corn gluten feed (0).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Goatcher, W.D., Church, D.C. 1970. J. Anim. Sci. 30:777-783.
- Herskin, M.S., Munksgaard, L. 2000. J. Anim. Sci. 78:2323-2328.
- Ishihara, N., Chu, D., Akachi, S., Juneja, L.R. 2001. Livestock Prod. Sci. 68: 217-229.
- Nombekela, S.W., Murphy, M.R. 1995. J. Dairy Sci. 78:880-885.
- Ray, D.E., Roubicek, C.B., 1971. J. Anim. Sci. 33:72-76.
- Rumbo, M., Schiffrin, E.J. 2005. Cell Mol. Life Sci. 62: 1288-1296.
- Terré, M., Bach, A., Devant, M., 2006. J. Dairy Res. 73: 480-486.

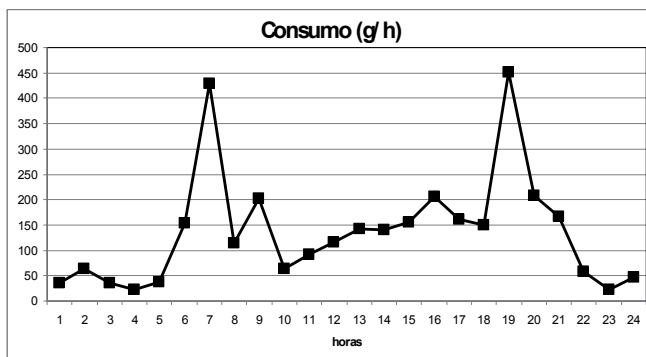


Figura 1. Patrón de ingestión y consumo medio de los animales expresado en gramos por hora.

Tabla 1. Consumo medio (g/30min) por ingrediente de cada una de las pruebas.

Ingr.1	Ingr.2	Ingr.1	Ingr.2	P-valor	Ingr.1	Ingr.2	Ingr.1	Ingr.2	P-valor
Trigo	CGF	26,1	16,1	<0,05	Maíz	Arroz	66,8	17,9	<0,001
Trigo	Arroz	100,2	22,2	<0,001	Maíz	Avena	54,7	10,2	<0,001
Trigo	Avena	27,0	3,9	<0,001	Maíz	Terc.	19,5	10,8	<0,05
Trigo	Terc.*	43,7	14,9	<0,001	Maíz	Cebada	39,6	52,3	<0,05
Trigo	Cebada	28,5	11,7	<0,001	Cebada	CGF	20,8	10,8	<0,01
Trigo	Maíz	34,3	35,2	NS	Cebada	Arroz	91,7	32,5	<0,001
Trigo	Sorgo	59,6	12,6	<0,001	Cebada	Avena	78,2	12,0	<0,001
Sorgo	CGF	12,0	5,4	<0,001	Cebada	Terc.	30,4	47,7	<0,05
Sorgo	Arroz	38,8	5,5	<0,001	Terc.	CGF	35,8	16,3	<0,001
Sorgo	Avena	71,3	29,1	<0,001	Terc.	Arroz	29,9	10,2	<0,001
Sorgo	Terc.	59,8	48,4	NS	Terc.	Avena	16,0	71,3	<0,001
Sorgo	Cebada	40,0	18,9	<0,001	Avena	CGF	11,9	13,5	NS
Sorgo	Maíz	33,6	20,8	<0,01	Avena	Arroz	48,0	42,5	NS
Maíz	CGF	50,8	3,4	<0,001	Arroz	CGF	23,6	11,5	<0,01

* Terc.= Tercerillas

DEVELOPMENT OF AN ANIMAL MODEL TO EVALUATE ORO-SENSORIAL PREFERENCES IN WEANED CALVES AND DETERMINATING PREFERENCES FOR ENERGETIC INGREDIENTS

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop an animal model to evaluate oro-sensorial preferences in weaned calves and determine preferences for several common energetic ingredients: barley, corn, corn gluten feed, oats, rice, sorghum, wheat and wheat middlings. Several tests were performed to develop an animal model. First, the feeding pattern of 35 calves (65±0,7 d of age) was monitored over 24 h every 60 min to define the optimum moment to conduct the assays. Next, an experiment involving another 30 naive calves (65±0,7 d of age) were used to assess an initial model consisting on offering 2 feeds (control vs. control plus 10% of sugar) to each animal, in 2 separate buckets, and measure intake every 30 min over a 6-h period. Finally, 30 calves (65±0,9 d of age) were used to evaluate this animal model using a novel feed for the calves. A double choice of ground corn or barley were presented to all calves and feed consumption was registered over 6 h every 30 min. It was concluded that the animal model allowed detecting differences in oro-sensorial preferences when using a minimum of 20 animals per assay. Using this animal model, wheat was the most preferred ingredient in all assays but one ($P < 0,05$). On the other hand, corn gluten feed was the least preferred ingredient in all assays but one ($P < 0,05$).

Keywords: oro-sensorial, preferences, calves, palatability.

PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA EN DIETAS COMPLETAS: CLONACIÓN DE INSTRUMENTOS Y TRANSFERENCIA DE ECUACIONES NIRS EN PRODUCTO INTACTO

Soldado¹, A., De la Roza-Delgado¹, B., Martínez-Fernández¹, A., Vicente-Mainar¹, F., López², L. y Díaz-Bueno², E.

¹Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Área de Nutrición Animal, Pastos y Forrajes, 33300 Villaviciosa (Asturias). broza@serida.org

²Cooperativa del Valle de los Pedroches (COVAP), 14400 Pozoblanco, Córdoba.

INTRODUCCIÓN

Las exigencias nutricionales en vacuno lechero de alta producción han generalizado como sistema de alimentación las dietas completas (unifeed; DU), para favorecer el equilibrio entre nitrógeno y energía fermentable en el rumen, y optimizar la cantidad y calidad de las producciones, con la consiguiente reducción del impacto ambiental a través de la disminución de pérdidas de nutrientes en orina y heces (de la Roza et al., 2005).

Por otro lado, es bien conocida la capacidad de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como herramienta viable para predecir entre otros el valor nutritivo de alimentos para animales. De hecho el SERIDA lleva trabajando durante los últimos 20 años en esta tecnología y, ha conseguido implantarla, como alternativa rápida, exacta y precisa para el control de calidad de alimentos, con el consiguiente reconocimiento por parte de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) en el año 2004 (430/LE930), del cumplimiento de la Norma ISO-17025. Pues bien, la información acumulada y los avances en instrumentación y paquetes quimiométricos, han posibilitado la transferencia entre instrumentos de ecuaciones desarrolladas en producto intacto, siempre y cuando se utilice un algoritmo adecuado y se sigan protocolos de clonación validados NIRS.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la posibilidad de transferir ecuaciones NIRS desarrolladas para la predicción del valor bromatológico en alimentos tan heterogéneos como son las dietas unifeed en su estado natural entre equipos NIRS, situados en distintas localidades (Asturias y Córdoba). Una validación externa ha permitido corroborar que una adecuada estrategia de clonación posibilita transferir modelos de predicción NIRS en una matriz tan compleja como son las dietas unifeed (DU) húmedas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado dos colectivos de trabajo: a) la población de calibración formada por 183 muestras de DU, procedentes de diferentes explotaciones de la Cornisa Cantábrica y recopiladas en el Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA en los últimos 10 años b) el colectivo de validación constituido por un total de 10 muestras, seleccionadas aleatoriamente en COVAP y el SERIDA. La recogida de datos espectrales para el desarrollo de la calibración NIRS se llevó a cabo en un equipo monocromador NIRSystems 6500 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, MD, EE.UU.) dotado de módulo transport, con un rango de medida comprendido entre 400-2500 nm a intervalos de 2 nm, en modo reflectancia ($\log 1 / R$). Los espectros de las muestras se recogieron por duplicado utilizando una cápsula natural, con una ventana óptica de cuarzo de 4,7 x 20 cm, y posteriormente se utilizó el espectro promedio en el proceso de calibración.

Los parámetros analíticos evaluados han sido: materia seca (MS), cenizas, (CZ), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), extracto etéreo (EE), almidón (ALM), fibra bruta (FB), fibra ácido detergente (FAD) y fibra neutro detergente (FND). Los datos de referencia se obtuvieron a partir de parámetros analíticos determinados por las normas habituales en alimentación animal (AOAC, 1984). Asimismo, los análisis de referencia de las muestras de validación se realizaron siguiendo el procedimiento normalizado de trabajo PNTNANIR001, ensayo acreditado bajo el amparo de la norma ISO-17025.

La estandarización/clonación para la transferencia de ecuaciones NIRS en DU en su estado natural entre el equipo NIRSystems 6500 (master) del SERIDA y el NIRSystems 5000 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, MD, EE.UU.) de COVAP (satélite), que trabaja en un rango de medida más estrecho (1100-2500nm), se realizó recogiendo la información

espectral de un colectivo de ocho cápsulas rectangulares $\frac{1}{4}$ que contenían diferentes tipos de alimentos para animales en producto intacto: piensos compuestos, materias primas y dietas completas, en ambos equipamientos. La matriz de estandarización se realizó utilizando el algoritmo patentado por Shenk y Westerhaus (1989), y la clonación se llevó a cabo únicamente en la región NIR común en ambos instrumentos, 1100 a 2500 nm. Tanto para la recogida de datos espectrales como para el análisis quimiométrico se utilizó el software WinISI II versión 1.50 (Infrasoft International Inc., Port Matilda, PA, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se recogen los estadísticos de calibración de la ecuación NIRS para la determinación de los parámetros nutritivos de las DU desarrollada con los espectros NIRS del equipo del SERIDA tras una normalización y aplicación de la segunda derivada a los mismos. Atendiendo a los estadísticos de calibración y validación cruzada, observamos que la ecuación presenta una elevada capacidad predictiva, siendo los valores del ratio RER (Rango/ Error estándar de validación cruzada, ETVC) en todos los parámetros (excepto cenizas) superiores a 10, de acuerdo a las recomendaciones de Williams y Sobering (1996).

Tabla 1. Estadísticos de calibración y validación cruzada para la predicción NIRS de la composición bromatológica de dietas unifeed en estado natural.

	Rango	ETC	R ²	ETVC	r ²	RER
MS	26,08-61,05	0,943	0,9738	1,077	0,967	32,5
CZ	1,83-5,55	0,348	0,685	0,384	0,621	9,7
PB	3,73-9,90	0,373	0,869	0,441	0,819	14,0
FB	4,52-13,38	0,455	0,905	0,662	0,812	13,4
EE	0,94-3,36	0,197	0,761	0,208	0,736	11,6
ALM	2,03-13,08	0,886	0,769	1,001	0,710	11,1
FND	11,40-27,32	0,530	0,960	1,172	0,809	13,6
FAD	5,36-15,57	0,698	0,832	0,807	0,776	12,7

MS: materia seca, CZ: cenizas, PB: proteína bruta, FB: fibra bruta, EE: extracto etéreo, ALM: almidón, FAD y FND: fibra ácido y neutro detergente. ETC y ETVC: Errores estándar de calibración y validación cruzada, respectivamente. R² y r²: coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada, RER: Rango/ ETVC.

Tras incorporar la matriz de estandarización en el equipo satélite y predecir con la ecuación anteriormente descrita todas las DU del colectivo de validación, se llevó a cabo una evaluación del ajuste espectral obtenido, haciendo uso primeramente de las distancias espectrales medias global (GH) y vecinal (NH). Así, se ha observado que antes de la clonación la GH y NH medias del colectivo de validación en el equipo satélite tenía valores de 5,22 y 3,19 respectivamente, mientras que después de la clonación los valores son mejores (GH = 2,85 y NH= 1,64) y similares a aquellos obtenidos en el equipo master (GH = 2,29 y NH= 1,25).

Por otro lado, con el objeto de evaluar la exactitud de la clonación/estandarización realizada, y así comparar el funcionamiento de la ecuación transferida en los equipos master y satélite, se calculó el valor del error típico de las diferencias (ETD). En la Figura 1A se muestran los valores del ETD entre los datos obtenidos en: (1) los equipos master vs. satélite, (2) master vs. datos de referencia, (3) satélite vs. datos de referencia, para cada una de los parámetros bromatológicos incluidos en la calibración. En base a trabajos previos de investigación (Pérez Marín, 2005), es posible confirmar el éxito de la clonación y transferencia de la ecuación de DU en su estado natural, puesto que se alcanzan valores de ETD en la mayoría de los parámetros del mismo orden al ETVC. Las principales diferencias se observan en la MS y la FND, parámetros que poseen los mayores errores ETC y ETVC, debido en el primer caso a la dificultad de mantener el contenido inicial de agua de la muestra y en el segundo fundamentalmente a la heterogeneidad de la distribución de la fibra en la matriz.

Asimismo, se abordó la comparación de la predicción de los parámetros nutritivos entre los equipos master y satélite, para corroborar el ajuste entre los valores analíticos obtenidos en cada uno de los instrumentos. A modo de ejemplo, se representa gráficamente en la Figura

1B el ajuste obtenido para la predicción del contenido en PB. En este caso concreto, se obtuvo una correlación superior a 0,97.

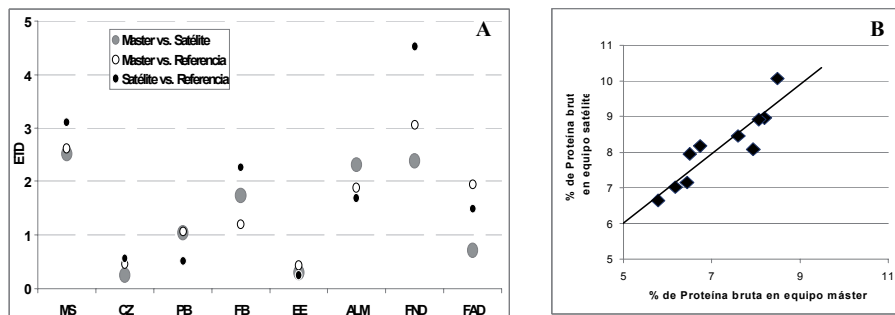


Figura 1. Evaluación de la clonación entre equipos NIRS: A) Valores del ETD para cada uno de los parámetros bromatológicos predichos B) Ejemplo de correlación entre los valores predichos para proteína bruta de las muestras del colectivo de validación en el equipo master (SERIDA) y el equipo satélite (COVAP).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. (1984) Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemist. 14th ed. ● De la Roza, B., Marbán, A., Paredes, E., Vicente, F., Rodríguez, M.L., Argumentería, A. 2005. ITEA N1 26: Tomo II. 650-652. ● Pérez-Marín, D.C., Tesis Doctoral, 2005. ● Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1989. U.S. Pat. 4866644, Sept, 12 ● Williams, P.C., Sobering, D., 1996. Near Infrared Spectroscopy: the future waves. Davies A.M.C., Williams P. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, pp 185-188.

Agradecimientos: Trabajo cofinanciado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) dentro del marco del proyecto RTA2008-00113-C02-01 y por la Corporación Tecnológica de Andalucía, en el marco de proyecto CTA06/105.

PREDICTION OF BROMATOLOGIC CONTENT OF RAW TOTAL MIXED RATIIONS: STANDARDIZATION AND TRANSFERENCE OF EQUATIONS BETWEEN NIR INSTRUMENTS

ABSTRACT: During the last few years, feed of dairy cows includes all ingredients in a total mixed ration encouraging the balance between nitrogen and fermentable energy in rumen. Moreover, this optimizes the quantity and quality of milk production, also minimizing environmental pollution by reducing nutrient losses from urine and faeces. Traditional wet chemical analysis of animal feeds has been used to characterize their bromatologic composition, but these procedures are costly, time-consuming and sometimes hazardous. In recent years, Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) has emerged as a robust and rapid alternative methodology for testing the quality and characterizing the composition of animal feeds. The objective of this work was to standardize NIR instruments allocated in different laboratories and to transfer NIR calibrations for a wide range of nutritive parameters based on scanning heterogeneous samples as Total Mixed Rations (TMR) and containing all ingredients as raw materials (even undried maize and grass silages). This study has been developed with one hundred and eighty three (n=183) TMR samples as calibration set and 10 external samples to validate transference and cloning procedure. Different statistical parameter: GH, NH and ETDC were evaluated to validate the calibration transference. Results have shown that GH decrease after standardization and ETDC is according with ETVC values.

Keywords: NIRS, raw materials, Total Mixed Ration, nutritive value, standardization

**APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS PARA ESTIMAR
LOS PARÁMETROS DE CINÉTICA DE FERMENTACIÓN RUMINAL
DE FORRAJES PROCEDENTES DE ZONAS ÁRIDAS DE TÚNEZ**

Opsi, F.¹, Ammar, H.², Andrés, S.¹, Kammoun, M.², González, J.S.¹, López, S.^{1*}

¹ Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León). 24346 León

² Institution de Recherche et d'Enseignement Supérieur Agricole (IRESA), Túnez
*s.lopez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

El valor nutritivo de los forrajes destinados a la alimentación de los rumiantes depende, en gran medida, de la composición química y de su utilización digestiva, en particular, de su fermentación en el rumen. Por tanto, es importante conocer la cinética de fermentación de los forrajes de manera rápida y sencilla para lograr un aprovechamiento adecuado de los mismos. La técnica de producción de gas (Theodorou et al., 1994) exige llevar a cabo incubaciones in vitro y mediciones del volumen de gas producido, que son laboriosas y se prolongan durante un tiempo relativamente largo. Es por ello que la técnica de producción de gas podría complementarse con la tecnología NIRS, ya que esta última permite obtener espectros de los forrajes en unos pocos segundos que podrían utilizarse posteriormente para estimar los parámetros de la cinética de producción de gas in vitro.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el presente trabajo se planteó con el objetivo de conocer en qué medida la tecnología NIRS es capaz de estimar, a partir de los espectros de 79 forrajes diferentes procedentes de una zona árida de Túnez, los parámetros calculados tras el ajuste de las respectivas curvas de producción de gas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se dispuso de un total de 79 forrajes diferentes (avena, cebada, ballico, trigo, veza, zulla, trébol, guisante, haba, alholva, mezclas de veza y avena, de veza y cebada, de zulla y avena, de avena y trébol) obtenidos en épocas y cortes diferentes en zonas áridas de Túnez. Estas muestras se secaron en estufa de aire forzado a 60°C y posteriormente se molieron con un molino de martillos tipo Culatti provisto de una malla de 1 mm de diámetro. Para obtener las cinéticas de fermentación y las curvas de producción de gas de las muestras de forrajes, se utilizó la técnica descrita por Theodorou et al. (1994). Con el fin de obtener los datos promediados, se utilizaron para cada muestra tres viales de 120 ml, en cada uno de los cuales se colocaron 500 mg de MS. Para incubar las muestras se dosificó dentro de cada vial, previamente gaseado con CO₂, 50 ml de líquido ruminal diluido en un medio de cultivo en proporción 1:4 (v/v), preparado según las indicaciones de Goering y Van Soest (1970). Tras precintar los viales, se colocaron en un incubador a 39°C y se midió la producción de gas (con un transductor de presión) a las 3, 6, 9, 12, 16, 21, 26, 31, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 horas. Cuando terminó el periodo de incubación (144 h) se abrieron los viales, se filtró su contenido en crisoles de placa filtrante y los residuos se secaron en una estufa de aire forzado a 60°C para determinar la desaparición de MS (Des 144 h). Las curvas de producción de gas se ajustaron utilizando el procedimiento NLIN (SAS, 1999) al modelo exponencial descrito por France et al. (2000), $PG = A [1 - e^{-c(t-L)}]$, donde PG es la producción acumulada de gas (ml/g MS) a un tiempo t (h) de incubación, A (ml) es la producción asintótica de gas, c (h⁻¹) es el ritmo fraccional de fermentación y L (h) el tiempo de retraso en el inicio de la degradación del sustrato. Además, la degradabilidad efectiva de la MS en el rumen (DG) para un determinado ritmo de paso (k) de la digesta se estimó a partir de la expresión matemática descrita por France et al. (2000). Las dos tasas de ritmo de paso asumidas en este trabajo fueron 0,03h, representativa de un nivel de ingestión bajo, y 0,06/h, representativa de un nivel de ingestión elevado.

Por otra parte, se recogieron los espectros de las 79 muestras de forraje mediante un espectrofotómetro de infrarrojos NIRSsystem 6500 conectado a un PC. Para ello, se introdujeron las muestras en cápsulas rectangulares con ventana de cuarzo que se

irradiaron con energía entre 400 y los 2500 nm, con el fin de obtener una medida de absorbancia cada 2 nm. Para cada muestra se recogieron 2 espectros en dos cápsulas distintas que finalmente fueron promediados y tratados con MSC y una segunda derivada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los rangos, valores medios y desviaciones estándar de los parámetros de producción de gas correspondientes a los 79 forrajes empleados en el presente estudio.

Tabla 1. *Parámetros de producción de gas*

	Conjunto de muestras de calibración (n=79)		
	Rango	Media	DE
A gas (ml)	189 – 453	299	57,1
c gas (h ⁻¹)	0,0184 – 0,0517	0,0332	0,0086
PG 24 h (ml)	97 – 223	154	27,5
Des 144 h (mg)	33 – 76	56	9,7
DG03	19 – 43	28	5,5
DG06	12 – 30	19	4,1

Por otra parte, en la Tabla 2 aparecen los estadísticos de bondad de ajuste de las ecuaciones de predicción NIR obtenidas mediante regresión por mínimos cuadrados parciales, con las que se observaron los errores estándar de validación cruzada (EE_{VC}) más bajos. Para todos los parámetros se observa una elevada correlación (R) entre los valores de referencia obtenidos a partir de las incubaciones in vitro y aquéllos estimados por la ecuación correspondiente. No obstante, excepto en el modelo con el que se estima la producción de gas asintótica (A gas), el número de términos (p) que es necesario introducir en cada ecuación es relativamente elevado, lo que hace pensar en un posible sobreajuste de las ecuaciones. El hecho de que el error estándar de validación cruzada (EE_{VC}) difiera en todas las ecuaciones en más de un 20% del correspondiente error estándar de calibración (EEC), y que la relación RPD sea inferior a 2,5 parece confirmar esta hipótesis.

Tabla 2. *Calibraciones obtenidas mediante el programa The Unscrambler versión 9.2 para estimar distintos parámetros de producción de gas a partir de tecnología NIRS*

	p	R	EEC	EE _{VC}	RPD
A gas	6	0,93	21,1	29,3	1,95
c gas	10	0,97	0,002	0,004	2,15
PG 24 h	7	0,89	12,5	17,6	1,56
Des 144 h	9	0,95	2,9	5,4	1,80
DG03	9	0,95	1,7	3,1	1,77
DG06	10	0,96	1,2	2,3	1,78

p: número de términos en la ecuación; R: coeficiente de correlación; EEC: error estándar de calibración; EE_{VC}: error estándar de validación cruzada; RPD: relación entre la desviación estándar del método de referencia y el error estándar de validación cruzada

En este sentido, es necesario recordar que el conjunto de muestras de forraje de calibración (n=79) estaba formado por monocultivos de gramíneas o de leguminosas, o por cultivos de mezclas de ambas, obtenidos en distintas fechas de siega y, por tanto, con diferentes grados de madurez. Este aspecto pudo introducir una enorme complejidad en esta muestra de forrajes, lo que podría justificar la dificultad de obtener ecuaciones NIR con una capacidad de predicción aceptable para estimar los parámetros de cinética de fermentación ruminal, a pesar de que los espectros NIR recogen información relativa a la composición química de los alimentos y, por tanto, a la medida en que los forrajes pueden ser digeridos en el rumen.

Una mayor homogeneidad de las muestras permitiría obtener ecuaciones de predicción específicas para cada tipo de forraje, con lo que sería posible conseguir una mayor exactitud de predicción de los parámetros relacionados con la cinética de fermentación ruminal de estos forrajes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., López, S., Bannink, A. 2000. *Br. J. Nutr.* 83, 143-150.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J. 1970. *Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures and some applications)*. USDA, Washington D.C., USA.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
- SAS, 1999. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, USA.

Agradecimientos: Proyecto financiado por la AECID (A/2692/05 y A/011878/07)

APPLICATION OF NIRS TECHNOLOGY TO ESTIMATING RUMINAL FERMENTATION KINETICS PARAMETERS OF FORAGES FROM ARID AREAS IN TUNISIA

ABSTRACT: The objective of this work was to assess the accuracy of prediction of fermentation kinetics parameters of forages from NIR spectra. Forages (79 samples including grasses, legumes or combinations grass-legume) were harvested from arid areas in Tunisia. Ruminal fermentation kinetics were determined in vitro by the gas production technique and NIR spectra were recorded. Prediction equations of rate and extent of forage degradation from NIR spectra were developed. Although a large percentage of variance could be accounted for by the models ($R > 0.89$), prediction equations could not be considered fully satisfactory, most likely due to the large heterogeneity of the forages included for calibration in the study.

Key words: NIRS, forage, nutritive value, rumen, fermentation kinetics, gas production

LOS ACEITES ESENCIALES PODRÍAN REDUCIR EL RIESGO DE CETOSIS EN CABRAS LECHERAS CON GESTACIÓN MÚLTIPLE

S. Cavini, S. Calsamiglia, A. Bouattour, A. Ferret y D. Bravo.
Universitat Autònoma de Barcelona; Pancosma, Francia.
cavinisara@yahoo.it

INTRODUCCIÓN

La cetosis es un trastorno del metabolismo de los carbohidratos y las grasas causado por un balance energético negativo, y se caracteriza por el aumento en la concentración de cuerpos cetónicos en plasma (Van Saun, 2000). En cabras, este síndrome es especialmente importante en las hembras al final de la gestación (toxemia de la gestación) y, sobre todo, cuando la gestación es doble. El incremento de las necesidades energéticas y la disminución de la ingestión son los factores desencadenantes, y en estas condiciones los animales son más susceptibles a otras patologías, comprometiendo su desempeño productivo y reproductivo. Las recomendaciones prácticas para reducir el riesgo de aparición de cetosis incluyen un buen manejo nutricional, basado principalmente en la administración de una ración rica en concentrados y/o el incremento de la ingestión de materia seca por parte del animal. De esta forma se favorece el incremento de la ingestión de energía y la proporción de propionato, el principal precursor de la gluconeogénesis en el rumiante. En Estados Unidos, la monensina se ha utilizado como promotor de la producción de propionato en ganado vacuno al principio de la lactación como estrategia para reducir la incidencia de cetosis. En Europa, el veto al uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal, ha motivado la búsqueda de otros aditivos alternativos, entre los que se incluyen los aceites esenciales de plantas (AE, Calsamiglia et al., 2007). Numerosos estudios realizados *in vitro* o en ganado bovino han evidenciado que ciertos AE, tales como el eugenol, y el cinamaldehído afectan el patrón de fermentación microbiana ruminal, evidenciado por una disminución en la relación acetato: propionato y la concentración de N amoniacal (Busquet et al., 2006). Por otro lado, también se ha observado que el capsicum incrementa la ingestión de materia seca (Cardozo et al., 2004, Busquet et al., 2005). Estos efectos podrían resultar beneficiosos en cabras lecheras con gestaciones múltiples, ya que se podría prevenir o reducir el riesgo de aparición de un cuadro de cetosis durante el parto.

El objetivo del experimento fue evaluar el efecto de la inclusión en la ración de una combinación de eugenol, cinamaldehído y capsicum sobre el rendimiento productivo y el riesgo de aparición de cetosis en cabras lecheras con gestación múltiple durante el parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 24 cabras de la raza Murciano-Granadina, alojadas en 4 corrales en grupos de 6 animales/tratamiento y 2 repeticiones, fueron asignadas a 2 tratamientos: a) Una dieta base sin aditivo como control (CTR); y b) La misma dieta suplementada con mezcla de Cinamaldehído, Eugenol y Capsicum (CEC, Pancosma, Suiza). El experimento se realizó durante el parto (desde los 15 días pre-parto hasta 30 días postparto). La mezcla de CEC se suministró con el alimento, el cual se ofreció una vez al día (2,5 kg/cabra), en forma de ración unifeed (60% forraje, 40% concentrado). Las cabras tuvieron acceso a agua *ad libitum*. Los parámetros medidos fueron: peso vivo (individual, una vez por semana); ingestión diaria de MS (grupo); producción de leche (tres veces por semana) y composición química de la leche (grasa, proteína y lactosa una vez por semana); y niveles plasmáticos de glucosa, insulina, ácidos grasos no esterificados (AGNE), triglicéridos y β -hidroxibutirato (BHB) los días -10, -7, -3, -2, -1, 0, +1, +2, +3, +5, +7, y +15; siendo 0 el día del parto. El diseño experimental fue bloques al azar y los datos obtenidos se analizaron utilizando el

PROC MIXED de SAS, con un nivel de significación establecido en $P < 0,05$, y las tendencias se discutirán a $P < 0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores medios para cada una de las variables estudiadas se presentan en la Tabla 1. La inclusión de CEC en la ración no mejoró ni la ingestión de materia seca ni la producción lechera, pero tuvo un efecto positivo en su composición, evidenciado por el aumento significativo en el contenido de proteína y grasa. El incremento en proteína podría justificarse a partir del incremento en propionato atribuido a la mezcla de cinamaldehído y eugenol, y la reducción de la desaminación (Busquet et al., 2006; Cardozo et al. 2006). Sin embargo, el aumento de grasa en leche es más difícil de justificar a partir de los resultados de fermentación ruminal obtenido en otros trabajos (Busquet et al., 2006; Cardozo et al., 2004 y 2006). Además, la adición de CEC redujo el nivel de BHB, y tendió a aumentar la insulina y a disminuir la concentración de AGNE. Busquet et al. (2006) y Cardozo et al. (2006) indicaron que la combinación eugenol-cinamaldehído favorece la síntesis de propionato a nivel ruminal, principal precursor para la gluconeogénesis en el hígado. El potencial aumento en la disponibilidad de glucosa justifica la tendencia al incremento en la concentración de insulina que, a su vez, justifica la reducción de la movilización de grasa del tejido adiposo (reducción de AGNE) y la producción de BHB en el hígado. Estos resultados sugieren que las cabras estuvieron expuestas a un menor riesgo de cetosis, y podría ser interesante realizar un ensayo parecido en el ganado vacuno lechero.

Tabla 1. Efecto de la inclusión de aceites esenciales de cinamaldehído, eugenol y capsicum en cabras durante el parto.

Parámetro	Tratamiento		Efecto	
	CTR	CEC	S.E.M.	P =
Producción de leche (ml/día)	1929	1931	404,9	0,974
Ingesta MS (g/cabra/día)	1674	1703	146,5	0,96
Grasa leche (%)	5,84	6,48	0,881	<0,001
Proteína leche (%)	3,69	3,86	0,352	0,008
Lactosa leche (%)	4,8	4,74	0,391	0,355
AGNE (mmol/l)	0,629	0,522	0,438	0,095
BHB (mmol/l)	0,534	0,445	0,245	0,012
Triglicéridos (mg/ml)	19,87	21,56	11,045	0,296
Insulina (μ g/l)	0,4	0,492	0,271	0,054
Glucosa (mg/dl)	56,34	57,24	12,108	0,607

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123/124:597–613.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761–771.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo P. W., Castillejos L., Ferret A. 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation: a review. *J. Dairy Sci.* 90:2580-2595.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2004. Effects of

natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. J. Anim. Sci. 82:3230–3236. • Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, C. Kamel. 2006. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. J. Anim. Sci. 84: 2801-2808. • Van Saun, R.J. 2000. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. JAVMA 217/10: 1536-1539.

ESSENTIAL OILS MAY REDUCE THE RISK OF KETOSIS IN DAIRY GOATS CARRYING TWINS

ABSTRACT: Dairy goats are highly susceptible to gestational ketosis. Ketosis is the result of an unbalance between energy supply and requirements. The hypothesis was that by increasing intake and glucose precursors (propionate), the indicators of ketosis will be reduced. Twenty four pregnant Murciano-Granadina goats carrying twins were used to study the effects of feeding a mixture of capsicum (that has been shown to stimulate intake) and eugenol plus cinnamaldehyde (that have been shown to promote propionate production in the rumen) on DM intake, milk production and composition, and blood profile. Goats were controlled from 2 weeks prior to 6 weeks after kidding. During the experiment, goats received a TMR diet (DM of a 60:40 forage: concentrate). Treatments were a control (CTR; no additive) and a mixture of capsicum eugenol and cinnamaldehyde (CEC, Pancosma, Switzerland). Intake and milk production were recorded daily, milk composition determined weekly, and blood samples taken days -10, -7, -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 15 around kidding to measure insulin, glucose, non-esterified fatty acids (NEFA), triglycerides and beta-hydroxy-butyrate (BOHB). Results were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS, differences declared at $P < 0.05$, and tendencies discussed at $P < 0.10$. No effects were found on feed intake or milk production, However, milk fat (6.48 vs. 5.84 g/Kg) and milk protein (3.86 vs. 3.69 g/kg) were higher in CEC compared with CTR. Plasma insulin concentration tended ($P = 0.05$) to be higher (0.49 vs. 0.40 $\mu\text{g/l}$), AGNE tended ($P = 0.09$) to be lower (0.52 vs. 0.62 mmol/l) and BOHB was lower (0.44 vs. 0.53 mmol/l) in the CEC treatment compared with CTR, respectively. Results suggest that the effects of the combination of cinnamaldehyde, eugenol and capsicum on ruminal fermentation increased the supply of glucose and reduced body fat mobilization, reducing the risk of ketosis during the periparturient period.

Keywords: Dairy goats, essential oils, rumen fermentation.

INCLUSIÓN DE *URTICA DIOICA* EN LA RACIÓN DE CORDEROS EN LA FASE DE CEBO

Bodas, R., López-Campos, Ó., Mantecón, A.R., López, S.*, González, J.S., Giráldez, F.J.
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). 24346 Grulleros. León
* s.lopez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

En condiciones de cebo intensivo, los corderos consumen elevadas cantidades de pienso compuesto (alrededor del 90% de la ración total), lo cual les permite expresar al máximo su potencial de crecimiento. Sin embargo, este tipo de alimentación favorece el desarrollo de episodios de acidosis, caracterizados por la acumulación de una gran cantidad de AGV y lactato en el rumen y el consiguiente descenso del pH del medio ruminal. Uno de los mecanismos para evitar o sobrellevar la carga ácida es la disminución en la ingestión de alimento, siendo las alteraciones en el consumo de pienso uno de los síntomas más evidentes (Nocek, 1997).

Las alteraciones a nivel ruminal y sistémico como resultado de la acidosis, junto con la disminución en la ingestión de alimento tienen como última consecuencia una disminución en el rendimiento productivo de los animales, además de verse mermados su salud y bienestar. Entre las alternativas posibles para paliar los efectos negativos asociados a la acidosis se encuentra el uso de sustancias naturales. En este sentido, el proyecto "Rumen-up", financiado por la Unión Europea (QLK5-CT-2001-00992), está investigando el potencial de un amplio rango de plantas para modificar la fermentación ruminal con el objetivo de desarrollar nuevas plantas o extractos de plantas que puedan ser utilizadas como alternativa a los aditivos químicos y los promotores del crecimiento (Wallace, 2004). Entre los objetivos de dicho proyecto se encuentran el descubrimiento de plantas con efectos contra la acidosis. Los estudios llevados a cabo *in vitro* pusieron de manifiesto que la adición de *Urtica dioica* (ortiga) prevenía la disminución del pH del medio de cultivo, siendo este efecto mayor cuanto más alta era la dosis empleada (Kliem et al., 2005a).

Tanto la comprobación de la repetibilidad de los resultados como la confirmación de la persistencia de los efectos han sugerido que esta planta podría ser incluida en la dieta para rumiantes para prevenir la aparición de fenómenos de acidosis (Kliem et al., 2005b). El objetivo del este trabajo es estudiar el efecto de la inclusión de un 5% de esta planta en raciones para corderos en la etapa de crecimiento cebo sobre la ingestión de alimento, la digestibilidad y el rendimiento productivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 24 corderos de raza Assaf, con un peso medio inicial de 15 kg, que fueron distribuidos en 2 grupos experimentales, en función de la inclusión o no de *U. dioica* en el pienso: grupo Control, con un 5% de harina de hojas (hierba deshidratada y molida) en el pienso, y grupo Urtica, con un 5% de esta planta. Los piensos estaban compuestos por (g/kg) trigo (158), cebada (444), maíz (118), torta de soja (148), harina de hojas o *Urtica dioica* (50), melaza (40), carbonato cálcico (15), corrector (10), cloruro sódico (7) y fosfato cálcico (2). La composición química puede verse en la Tabla 1.

Los corderos recibieron el correspondiente pienso concentrado, paja de cebada y agua a voluntad. El alimento fue suministrado a primera hora de la mañana, una vez recogidos los restos del día anterior, calculando la oferta para permitir un sobrante de, aproximadamente, un 20% del alimento ofrecido. Tanto la oferta de alimento como los restos fueron analizados semanalmente para determinar su contenido en materia seca.

Durante los días 23 a 29 del periodo experimental se realizó una prueba de digestibilidad, empleando 4 corderos por grupo, que fueron alojados en jaulas metabólicas. Tras dos días de adaptación a las jaulas, se recogieron las heces durante cinco días seguidos, pesándose y tomándose una alícuota del 10% para su análisis químico.

Los animales se pesaron dos veces por semana durante todo el periodo experimental, hasta que alcanzaron 24 kg de peso, y después cada dos días hasta alcanzar el peso al sacrificio (25 kg, Tabla 2). Cuando los animales alcanzaron los 25 kg de peso vivo fueron sacrificados, registrándose el peso de la canal tras 24 horas de oreo a 4°C.

Los análisis para determinar el contenido de materia seca, proteína bruta y cenizas se realizaron de acuerdo con la AOAC (2003). El contenido en FND fue determinado por el método de Van Soest *et al.* (1991).

La ganancia diaria de peso se estimó por regresión lineal. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 1999).

Tabla 1. Composición de los piensos experimentales (Control y Urtica) y la paja de cebada (g/kg)

	Control	Urtica	Paja
Materia seca	887	885	944
Proteína bruta	129	128	20
Fibra neutro detergente	143	128	438
Cenizas	65	68	48

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestran los valores medios de peso inicial y final, ingestión, digestibilidad, ganancia de peso, índice de conversión, peso de la canal y rendimiento comercial de la canal de ambos grupos experimentales. Como se puede apreciar en dicha tabla, los animales que recibieron un 5% de *U. dioica* en el pienso mostraron una tendencia a incrementar el consumo de alimento en torno al 8% ($P < 0,10$). No obstante, no se produjeron modificaciones estadísticamente significativas en la digestibilidad de nutrientes, la ganancia diaria de peso y el índice de conversión ($P > 0,10$).

En relación a los datos obtenidos tras el sacrificio de los animales, el peso de la canal de los corderos del grupo Urtica fue significativamente mayor que de los del grupo Control ($P < 0,05$), si bien el rendimiento comercial de la canal no se vio afectado ($P > 0,10$).

Tabla 2. Valores medios de peso, ingestión, digestibilidad y rendimientos para cada tratamiento experimental

	Control	Urtica	s.e.d.	
Peso inicial (kg)	14,9	15,0	0,27	NS
Peso final (kg)	25,1	25,4	0,22	NS
Ingestión (g MS·animal ⁻¹ ·día ⁻¹)				
Pienso	735	798	34,2	T
Paja	41	42	6,0	NS
Total	776	841	34,2	T
Digestibilidad (%)				
Materia seca	78,2	78,8	2,45	NS
Proteína bruta	73,0	74,3	3,33	NS
Fibra neutro detergente	31,1	35,3	6,51	NS
Ganancia diaria de peso (g·animal ⁻¹ ·día ⁻¹)	246	267	14,9	NS
Índice de conversión de la materia seca	3,19	3,19	0,174	NS
Peso de la canal fría (kg)	11,5	12,0	0,19	*
Rendimiento comercial (%)	46,2	47,5	0,85	NS

NS = $P > 0,10$; T = $P < 0,10$; * = $P < 0,05$

Los patrones erráticos de consumo de pienso provocados por la acidosis conllevan asociada una disminución en el consumo de materia seca total (Nocek, 1997). El empleo de aditivos que permitan paliar la acidosis puede traducirse en un incremento en el consumo de alimento. En este sentido, la utilización de entre un 2 y un 4% de bicarbonato sódico en el pienso de corderos en cebo ha dado lugar a incrementos en la ingestión total de materia seca (Bodas et al., 2003). De forma similar, en el presente experimento, la incorporación de un 5% de *U. dioica*, ha dado lugar a una tendencia al incremento en el consumo de pienso.

Por otra parte, se ha apuntado a que una mejora en las condiciones ruminales y el aumento en la ingestión de materia seca podría dar lugar a mejores ritmos de crecimiento (Bodas et al., 2003). En nuestro estudio no se observaron cambios estadísticamente significativos en estos parámetros. No obstante, conviene destacar el aumento en el peso de la canal fría de los animales del grupo Urtica. Este incremento en el peso de la canal fría podría estar relacionado, por una parte, con el aumento en el consumo de alimento y, por otra, con una mejora, si bien no significativa, en la ganancia diaria de peso, que fue, de media, un 8% mayor para los corderos que recibieron *U. dioica* en el pienso.

El empleo de *U. dioica* para paliar la acidosis en corderos en condiciones de cebo intensivo tendió a incrementar el consumo de materia seca de alimento y aumentó el peso de la canal fría, si bien no se produjeron modificaciones significativas en la digestibilidad, el ritmo de crecimiento y el índice de conversión. Kliem et al. (2005a) sugirieron que *U. dioica* podría inhibir el crecimiento de las poblaciones bacterianas que predominan durante los procesos de acidosis. Es necesario, no obstante, establecer el mecanismo de acción, estudiar sus efectos concretos sobre el rumen *in vivo*, así como las posibles repercusiones que pueda tener sobre las características de la canal y de la carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC, 2003. AOAC International, Gaithersburg, MD (USA).
- Bodas, R., Mantecón, A.R., Frutos, P., López, S. & Giráldez, F.J. 2003. *ITEA*, Extra 24, 768-770.
- Kliem, K., Morgan, R. & Mould, F. 2005a. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 225.
- Kliem, K.; Morgan, R. & Mould, F. 2005b. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 226.
- Nocek, J.E. 1997. *J. Dairy Sci.* 80, 1005-1028.
- SAS, 1999. SAS Publishing, Cary, NC (USA).
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Wallace, R.J. 2004. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 621-629.

Agradecimientos: Proyecto RUMEN UP financiado por la Unión Europea (QLK5-CT-2001-00992)

URTICA DIOICA AS ADDITIVE IN THE CONCENTRATE FOR FATTENING LAMBS

ABSTRACT: Twenty four Assaf lambs (15.0 ± 0.27 kg) were used to study the effects of the inclusion of 5% of Urtica dioica in the concentrate on feed intake and digestibility and animal performance. Animals were allocated into two groups (Control and Urtica) and fed concentrate and barley straw ad libitum. From day 23 to 29 a digestibility trial was conducted using 4 lambs per group. Lambs were slaughtered when they reached 25 kg. Concentrate and dry matter intake tended to be greater for Urtica lambs (P<0.10). Dry matter, fibre and protein apparent digestibility, growth rate and feed to gain ratio did not change (P>0.10) among experimental groups. On the other hand, carcasses from lambs fed the Urtica concentrate were heavier (P<0.05), although killing-out percentage was not affected (P>0.10).

Keywords: acidosis, intake, rumen, Urtica

EFFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ACEITES VEGETALES EN RACIONES DE CEBO DE CORDEROS SOBRE LA DIGESTIBILIDAD Y LOS RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS

Castro, T.^{1*}, Manso, T.², Jimeno V.³, Isabel, B.¹ y Rodríguez E.³.

¹Dpto. Producción Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. 28040 Madrid.

²E.T.S. Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. 24004 Palencia

³Dpto. Producción Animal. E.U.I.T. Agrícola. UPM. 28040 Madrid

*tcastro@vet.ucm.es

INTRODUCCIÓN

Las grasas se utilizan en las raciones de cebo de rumiantes para aumentar la densidad nutritiva y para modificar la composición de la grasa. Sin embargo, la inclusión de grasas se suele acompañar de una reducción en la digestión de los hidratos de carbono estructurales, tanto más acusada cuanto más insaturada es la grasa que se incorpora en la ración (Sauvant y Bas, 2001). El objetivo de este trabajo ha sido estudiar los efectos de la suplementación con distintas fuentes de grasas de origen vegetal (aceite de palma hidrogenada, aceite de oliva y aceite de soja) sobre la digestibilidad de la ración y de los ácidos grasos, y los rendimientos productivos, en corderos de raza Merina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 18 corderos machos de raza Merina con un peso inicial de $23 \pm 2,34$ kg. Los corderos se alojaron en jaulas individuales y se distribuyeron al azar en los grupos experimentales: Palma (4% de aceite de palma hidrogenado), oliva (4% de aceite de oliva), soja (4% de aceite de soja). Todos los piensos se formularon para que fueran isoenergéticos (1,08 UFC/kg MS), isoproteicos y un con contenido similar de EE (60 g/kg MS). Los piensos experimentales, su composición química y su composición en AG se presentan en las tablas 1 y 2 respectivamente. Los corderos recibieron como forraje paja de cereales *ad libitum* y dispusieron de agua limpia a voluntad.

Tabla 1. Piensos experimentales

Materias primas (%)	Palma	Oliva	Soja
Cebada	40,0	40,0	40,0
Maíz	18,1	18,1	18,1
Trigo duro	17,9	17,9	17,9
H. Soja 47	16,8	16,8	16,8
Aceite de Palma Hidrogenada	4,0	-	-
Aceite de Oliva	-	4,0	-
Aceite de Soja	-	-	4,0
Calcita mineral	1,5	1,5	1,5
Cloruro Sódico	0,4	0,4	0,4
Bicarbonato Sódico	0,8	0,8	0,8
Corrector Vitamínico Mineral	0,5	0,5	0,5
Composición química (g/kg MS)			
MS	916,6	925,2	929,0
MO	946,3	944,9	946,9
Proteína Bruta	178,3	165,2	179,2
FND	118,8	114,5	115,4
FAD	37,1	40,2	36,6

Tras un periodo de 14 días en que se controló diariamente la cantidad de alimento consumido por cada animal, se procedió a la recogida total de heces emitidas durante 6 días consecutivos. Para la recogida de heces los animales se equiparon con arneses. Los animales se sacrificaron a los 30 días de comenzar la prueba experimental, obteniendo el Peso Vivo al Sacrificio y el Rendimiento canal de cada cordero.

Con las muestras de alimentos y heces se realizaron las siguientes determinaciones analíticas: Humedad, N total y cenizas (AOAC, 1990); el contenido en FND y FAD se realizó según la técnica propuesta por Van Soest et al. (1991) utilizando el analizador de fibra

ANKOM200/220. La extracción y cuantificación de los ácidos grasos de los piensos y heces se realizó por el procedimiento descrito por Sukhija y Palmquist (1998).

Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza. El nivel de significación entre medias se estableció siguiendo el método de LSD.

Tabla 2. Composición en AG (g/kg MS) de los piensos experimentales

	Palma	Oliva	Soja
Total AG	63,8	61,4	60,8
C16:0	8,05	9,02	8,05
C18:0	17,04	1,98	2,19
<i>cis</i> -9 C18:1	12,48	29,06	8,33
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C18:2	12,92	17,00	31,62
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> 15 C18:3	0,98	1,30	3,52

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 3 se presentan los valores medios del peso vivo inicial, ganancia media diaria, ingestión de alimentos, índices de conversión, peso al sacrificio y rendimiento a la canal para los distintos tratamientos experimentales.

Todos los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de valores observados en otros trabajos sobre cebo intensivo de corderos en esta raza y en condiciones similares (Manso et al., 2006). Como se puede observar, el tipo de aceite incorporado a la ración no afectó de forma estadísticamente significativa a ninguno de los parámetros estudiados ($P > 0,05$).

Tabla 3. Peso Vivo Inicial, ingestión de concentrado (IC), Ingestión de forraje (IF), Ganancia Media Diaria, índice de conversión de la materia seca total (ICMS), índice de conversión de concentrado (ICC).

	Palma	Oliva	Soja	e.s	Nivel sig.
Peso Vivo Inicial	25,4	24,26	24,22	2,325	NS
Ing. Concentrado (g/d)	893,5	911,5	890,4	127,49	NS
IC (g/kg PV0,75/d)	75,16	78,76	77,82	9,287	NS
IF(g/d)	72,91	72,14	72,33	5,759	NS
IF (g/kg PV0,75/d)	6,18	6,23	6,35	0,655	NS
GMD (g/d)	291,2	304,2	243,8	84,96	NS
ICMS	3,45	3,42	4,22	0,886	NS
ICC	3,18	3,16	3,89	0,8001	NS
Peso Vivo Sacrificio	31,6	30,88	29,44	3,608	NS
Rendimiento a la canal (%)	47,36	48,07	49,09	24,15	NS

e.s: error estándar

En la tabla 4 se recogen los valores de digestibilidad aparente de las raciones experimentales. La incorporación de aceite de soja redujo la digestibilidad de la FND y FAD comparado con el de aceite de palma y de oliva. La digestibilidad aparente del total de AG en la dieta con palma fue menor que en las de oliva y soja, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,107$). La digestibilidad PB no se vio afectada por el tipo de aceite incorporado a la ración ($P > 0,05$).

Tabla 4. Digestibilidad aparente de la FAD, FND, MO, MS, PB.

	Palma	Oliva	Soja	e.s	Nivel sig.
MS	0,83	0,81	0,79	0,025	0,101
MO	0,84	0,82	0,80	0,024	0,104
PB	0,81	0,77	0,76	0,039	0,215
FAD	0,45 ^a	0,41 ^a	0,30 ^b	0,083	0,036
FND	0,50 ^a	0,45 ^{ab}	0,38 ^b	0,07	0,052
Total AG	0,87	0,90	0,90	0,0262	0,107

e.s: error estándar.

La inclusión de lípidos no protegidos en la raciones de rumiantes, se asocia con efectos negativos sobre la digestión ruminal de los hidratos de carbono estructurales (Sauvant y Bas, 2001).

Esta reducción es más acusada con grasas insaturadas, particularmente con aceites ricos en ácido linoléico (Jenkins, 1993). Nuestros resultados coinciden con los publicados por Appeddu et al. (2004) y Ramana Reddy et al. (2003). Doreau et al. (1997) indican que la reducción que se observa en la digestibilidad de la MO es debida a la fracción fibrosa, sin modificar la digestión del almidón, lo que podría explicar la ausencia de efecto sobre los parámetros productivos. La tabla 5 muestra los valores de la digestibilidad de los AG.

Tabla 5. Digestibilidad aparente y contenido en AG de las heces (g/kg).

	Palma	Oliva	Soja	e.s	Nivel sig.
Digestibilidad					
C16:0	0.889 ^a	0.999 ^b	0.999 ^b	0.0252	0.0000
C18:0	0.795 ^a	-0.837 ^b	-0.675 ^b	0.3804	0.0000
cis-9 C18:1	0.870 ^b	0.951 ^a	0.890 ^b	0.0390	0.0040
cis-9, cis-12 C18:2	0.956 ^b	0.982 ^a	0.986 ^a	0.0113	0.0004
cis-9, cis-12, cis 15 C18:3	0.925 ^c	0.950 ^b	0.976 ^a	0.0125	0.0000
Total saturados	0.839 ^a	0.648 ^b	0.639 ^b	0.0733	0.0002
Total no saturados	0.9122 ^b	0.956 ^a	0.954 ^a	0.0212	0.0028
Contenido en heces					
C18:0	16.633	18.343	16.644	4.1056	0.6817
trans-11 C18:1	0.192 ^b	0.397 ^{ab}	0.526 ^a	0.0237	0.0641
cis-9, trans-11 C18:2	0.0891	0.0420	0.0772	0.0442	0.1604
cis-10, trans-12 C18:2	0.0532	0.0496	0.0579	0.0336	0,8983

e.s: error estándar.

A pesar de la diferente ingestión de C18:0 con la dieta de aceite de palma frente a las de oliva y soja, no se apreciaron diferencias significativas en el contenido de este ácido graso en las heces, dando lugar a los valores negativos en la digestibilidad observados. Esto refleja la biohidrogenación que sufren los AG insaturados en el rumen.

Nuestros resultados parecen indicar que la inclusión de un 4% de aceite de soja en el concentrado de corderos en crecimiento reduce la digestibilidad de los hidratos de carbono estructurales, sin afectar los rendimientos productivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC, 1995. O, Washington, DC, USA.
- Appeddu, L.A., Ely, D.G., Aaron, D.K., Deweese, W.P., Fink, E., 2004.. J. Anim. Sci. 82: 2780
- Doreau, M., Chilliard, Y., 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. Br. J. Nutr. 78: • Jenkins, T.C. (1993).. J. Dairy Sci. 76:3851-3863.
- Manso, T., Castro T., Mantecón, A.R. y Jimeno, V. 2006. Anim. Feed Sci. Technol. 127:175
- Ramana Reddy, Y., Krishna, N., Raghava Rao, E., Janardhana Reddy, T., 2003. Anim. Feed Sci. Technol. 106: 29–38.
- Sauvant, D., Bas, P., 2001. INRA Prod. Anim. 14: 303–310.
- Sukhija, P.S., y D.L. Palmquist. 1988. J. Agric.Food Chem. 36: 1202.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. J. Dairy Sci. 74: 3583–3597

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por financiado por la Universidad Complutense de Madrid. (PR1-A/07-15403)

EFFECT OF VEGETABLE FATS IN FATTENING LAMBS ON DIGESTIBILITY AND ANIMAL PERFORMANCE

ABSTRACT: Eighteenth lambs (23±2.34 kg) were used to study the effects of the addition of 4% hydrogenated palm oil, 4% olive oil and 4% soybean oil to the concentrate for fattening lambs on digestibility and animal performance. Lambs were fitted with harnesses for faecal collection. Soybean oil decreased apparent digestibility of DM, OM, ADF and NDF. Animal performance was not affected by the treatments.

Keywords: vegetable oils, fattening lambs, digestibility, animal performance

EL USO DE GLICERINA EN DIETAS DE CORDEROS Y OVEJAS

M. Terré¹, P. Casado² y A. Bach^{1,3}

¹IRTA-Unitat de Remugants. Caldes de Montbui, Barcelona. marta.terre@irta.es

²GEPISA, Soria

³ICREA, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La glicerina es un subproducto derivado de la producción de biodiesel, que contiene 80-90% de glicerol, 9-12% de sal y trazas de metanol. La glicerina puede ser usada tal cual (80% de glicerol) o bien destilada para uso farmacéutico (99% glicerol). Actualmente, la mayoría de la glicerina se usa en la industria farmacéutica, pero el incremento de la producción de biodiesel podría crear excedentes de glicerina que podrían utilizarse en la alimentación de rumiantes como substrato gluconeogénico (Chung et al., 2007). Es decir, podría entrar a formar parte de la dieta de los rumiantes como substitutivo de fuentes de energía como son los cereales, pudiendo reducir así los costes de la ración.

Este estudio tiene como objetivo estudiar los efectos a nivel productivo, metabólico, y ruminal de la inclusión de la glicerina en el pienso concentrado de corderos de engorde y en la dieta de las ovejas en lactación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio en corderos

Para el estudio del uso de glicerina en la dieta de corderos de engorde se usaron 39 corderos de la raza Ripollesa (40±3,9 días, 15±1,3 kg de PV) repartidos en 3 tratamientos (3 grupos por tratamiento): 0% glicerina (0G), 5% glicerina (5G), 10% glicerina (10G) en el pienso concentrado. Los corderos se alimentaron con su pienso tratamiento y paja a discreción hasta llegar al peso de matadero 24±1,1 kg de PV. Los piensos fueron isoproteicos e isoenergéticos (18,2% PB, 4,36 Mcal EB/kg MS). A lo largo del estudio los corderos se pesaron semanalmente, y se determinó el consumo de pienso, paja y agua por corral semanalmente. Cada dos semanas se tomó una muestra de sangre para medir los niveles de glucosa e insulina. También se registró el rendimiento de la canal de los corderos.

Estudio en ovejas

Para estudiar el uso de la glicerina en dietas de ovejas en lactación se utilizaron 35 ovejas de la raza Ripollesa repartidas en 3 tratamientos (2 lotes de ovejas por tratamiento) que incluían 3 niveles distintos de glicerina en el pienso concentrado 0% glicerina (0G), 3% glicerina (3G) y 5% glicerina (5G). Las ovejas se alimentaron con 1,32 kg MS de concentrado (14,2% PB, 4,32 Mcal EB/kg MS) y paja a discreción. Se determinó la condición corporal de las ovejas antes y después del parto y una semana antes de finalizar la lactación. Se midió el consumo semanal de paja, y se tomaron muestras de sangre cada 2 semanas para medir los niveles de glucosa, insulina, AGNE y β-hidroxibutirato. También se tomó una muestra de líquido ruminal 2 semanas después de que parieran todas las ovejas del lote para determinar su pH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros productivos analizados en los corderos de engorde (Tabla 1). La interacción del tratamiento con el tiempo en la ganancia media diaria (GMD) de los corderos se debe a los cambios significativos de GMD del grupo 0G en comparación con la constante GMD de los grupos 5G y 10G a lo largo del estudio. A pesar de observar diferencias numéricas en los parámetros

de insulina (0,14, 0,18, 0,23 \pm 0,041 μ g/l en los tratamientos 0G, 5G y 10G, respectivamente) y la relación insulina:glucosa (28,4, 35,7, 43,3 \pm 6,40 en los tratamientos 0G, 5G y 10G, respectivamente) éstas no fueron significativas.

En relación a las ovejas tampoco se encontraron diferencias significativas a nivel de los parámetros productivos, metabólicos y de pH ruminal (6,9, 6,8, 6,8 \pm 0,23 en los tratamientos 0G, 3G y 5G, respectivamente) entre las ovejas que comían los 3 tipos de concentrado.

Mach et al. (2009) engordaron terneros Holstein durante 91 días con piensos que incluían 0, 4, 8 y 12% de glicerina en su fórmula, y concluyeron que la inclusión de glicerina hasta un 10% del total de la materia seca ingerida no tenía efectos negativos sobre la producción, la fermentación ruminal, el metabolismo y la calidad de la canal y de la carne.

La inclusión de glicerina en el pienso de los corderos hasta un 10% y en el pienso de ovejas hasta un 5% puede usarse en la dieta de corderos de engorde y de ovejas en lactación sin afectar su crecimiento, la ingestión de materia seca, y los parámetros sanguíneos metabólicos estudiados en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chung, Y. H., Rico, D. E., Martinez, C. M., Cassidy, T. W., Noirot, V., Ames, A. & G. A. Varga. 2007. J. Dairy Sci. 90:5682-5691.
- Mach, N., Bach, A. & Devant, M. 2009. J. Anim. Sci. 87:632-638.

Tabla 1. Parámetros productivos de corderos alimentados con un pienso con 0% glicerina (0G), 5% glicerina (5G) o 10% glicerina (10G) a lo largo de 4 semanas.

	Tratamientos ^a				P - valor ^b		
	0G	5G	10G	EEM ^c	T	t	Txt
Peso Inicial, kg	15,3	15,3	15,3	1,3	-	-	-
Peso 4 semanas, kg	22,6	23,2	23,0	0,67	0,58	<0,001	0,03
GMD, kg/d	0,27	0,28	0,29	0,030	0,94	0,11	0,01
Consumo de pienso, kg/sem ^d	4,10	4,15	4,35	0,554	0,94	<0,001	0,74
Consumo de paja, kg/sem ^d	2,4	2,1	1,9	0,19	0,31	0,29	0,84
Índice de conversión pienso	0,46	0,47	0,46	0,067	0,99	0,23	0,46
Índice de conversión total	0,38	0,35	0,32	0,051	0,64	0,002	0,70
Consumo de agua, l/sem	6,8	10,0	9,3	1,96	0,54	0,004	0,19
Rendimiento de la canal, %	43,1	43,1	44,7	0,65	0,94	-	-

^a 0G=corderos alimentados con un pienso 0% glicerina; 5G=corderos alimentados con un pienso 5% glicerina; 10G= corderos alimentados con un pienso 10% glicerina

^bT=efecto del nivel de inclusión de glicerina en el pienso; t=efecto del tiempo; Txt=interacción del efecto de inclusión de glicerina con el tiempo

^c error estándar de la media

^dkg de pienso/paja por cordero a la semana

Tabla 2. Parámetros productivos de ovejas alimentadas con un pienso con 0% glicerina (0G), 3% glicerina (3G) o 5% glicerina (5G) a lo largo de la lactación.

	Tratamientos ^a				P - valor ^b		
	0G	3G	5G	EEM ^c	T	t	Txt
Condición corporal	2,5	2,6	2,6	0,08	0,59	<0,001	0,26
Consumo de pienso, kg MS/ov/d	1,33	1,33	1,33	-	-	-	-
Consumo de paja, kg MS/ov/d	0,80	0,76	0,77	0,041	0,80	0,37	0,48
Consumo de agua, l/ov/d	4,1	3,0	3,5	0,81	0,66	0,19	0,92
Índice de conversión pienso	0,46	0,47	0,46	0,067	0,99	0,23	0,46
Índice de conversión total	0,38	0,35	0,32	0,051	0,64	0,002	0,70

^a 0G=ovejas alimentadas con un pienso 0% glicerina; 3G=ovejas alimentadas con un pienso 3% glicerina; 5G= ovejas alimentadas con un pienso 5% glicerina

^bT=efecto del nivel de inclusión de glicerina en el pienso; t=efecto del tiempo; Txt=interacción del efecto de inclusión de glicerina con el tiempo

^c error estándar de la media

THE USE OF GLYCERIN IN LAMBS AND EWES DIETS

ABSTRACT

Thirty-nine Ripollesa weaned lambs were arranged in 3 groups to study three diets with 0%, 5% or 10% glycerin in the concentrate. Lambs were fed the treatment concentrate and straw ad libitum until the slaughter weight (24 kg). Animals were grouped in groups of 5 or 4 lambs, they were weighed weekly, and concentrate and straw intake and water consumption were measured weekly. Blood samples to determine glucose and insulin concentrations were obtained at 2 and 4 wk, and carcass weight was recorded at the slaughterhouse. Thirty-five Ripollesa ewes were arranged in 3 groups to study three diets with 0%, 3% or 5% glycerin in the concentrate diet. Ewes were grouped in 6 groups of 6 or 5 ewes and were fed 1.32 kg DM of a concentrate and straw ad libitum. Straw intake was measured daily, and water consumption weekly. Blood samples were obtained every 2 wk to determine glucose, insulin, NEFA and β -hydroxybutyrate.

None of the parameters measured in lambs and ewes were affected by the glycerin content of concentrate. Glycerin can be included as an ingredient in lamb and ewe diets without impairing the lambs growth, without reducing concentrate or straw intake, and without affecting blood metabolites.

Keywords: lambs, ewes, glycerin

EVALUACIÓN DEL POLIETILENGLICOL (PEG6000) COMO MARCADOR INDIGESTIBLE PARA OVEJAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN O PASTOREO

G. Caja², V.M. Ralha³ y E. Albanell²

²Grup de Recerca en Remugants (G2R), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

³Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal
gerardo.caja@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El polietilén glicol (**PEG**) es un poliéter ($\text{HO}[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_n\text{-H}$) utilizado frecuentemente en la industria alimentaria. Los PEG de bajo peso molecular (PEG400) se usan como aditivos farmacológicos de uso clínico (Chadwick et al., 1977). MacRae (1974) ya discutió el uso de PEG400 como marcador de fase líquida en rumiantes y sus limitaciones por la interacción con los taninos y las dificultades de su análisis turbidimétrico. Por otro lado, PEGs de elevado peso molecular (4000-6000) han sido propuestos como marcadores indigestibles en humanos (Schiller et al., 1997), caprinos (Landau et al., 2002) y ovinos (Hassoun et al., 2007). Su interés actual se basa en la facilidad de análisis por espectrofotometría de infrarrojo cercano (NIRS). Sin embargo, el PEG puede producir distintas interacciones alimentarias, como son: neutralización de taninos y aumento del consumo de especies arbustivas en pastoreo al utilizar PEG4000 (Decandia et al., 2000, 2008), y aumento del contenido en agua de las heces (laxante) al utilizar PEG6000 (Hassoun et al., 2007). El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad del PEG6000 como marcador indigestible para estimar la ingestión individual de ovejas lecheras alimentadas en grupo con raciones de heno y concentrado o con praderas intensivas y complementación en el aprisco.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 ovejas lecheras adultas de raza Manchega a final de lactación, divididas en 2 grupos equilibrados según peso y producción de leche. Cada grupo se asignó al azar a un tratamiento alimentario: **IN** (alimentación con heno y concentrado en aprisco) y **OUT** (pastoreo de raygrás y complementación con heno y concentrado en el aprisco). Las ovejas se alojaron en corrales contiguos de 6 m² en la granja experimental del S1GCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) de la Universitat Autònoma de Barcelona. La ración IN consistió en festuca deshidratada (*Festuca arundinacea* S.; 90,9% MS; 10,6% PB, 61,3% FND y 31,1% FAD, sobre MS) ad libitum (115% del consumo del día anterior) y 0,6 kg/d de concentrado (89,5% MS; 21,3% PB, 13,0% FND y 5,5% FAD, sobre MS) administrado en la sala de ordeño (8:00 y 17:00 h). En la ración OUT, las ovejas pastaron durante 6 h/d (10:00-16:00 h) un raygrás italiano (*Lolium multiflorum* L.; 16,9% MS; 30,7% PB, 50,0% FND y 24,9% FAD, sobre MS) y se complementaron con 0,6 kg/d de concentrado (en sala de ordeño) y festuca ad libitum (en corral). Las ovejas se ordeñaron 2 veces/d y se equiparon con arneses y bolsas para la recogida de heces (Caja, 1975). Una vez adaptadas a las raciones y condiciones experimentales (21 d), cada oveja recibió 50 g (precisión 0,1 g) de PEG6000 (Panreac, Castellar del Vallés, Barcelona) que se administró por vía oral durante 10 d, en dosis única y diluido al 50% (p/p) en agua destilada, después del ordeño de la mañana y antes de ofrecer la ración o salir al pasto. La recogida de heces se realizó 2 veces al día (7:00 y 16:00 h) durante los últimos 5 d experimentales. Las heces fueron conservadas a 4°C y utilizadas para preparar una alícuota (10% en peso) por oveja-día y oveja-periodo. Análogamente, se prepararon muestras alícuotas de los alimentos utilizados durante los últimos 10 d experimentales que se analizaron junto con las muestras de heces (Van Soest et al., 1991; AOAC, 1995). La producción y la composición de leche se valoró semanalmente mediante un autoanalizador NIRS (Foss NIRSystems 5000, Hillerød, Dinamarca). Para el análisis NIRS del PEG en heces se realizó una calibración con 44 muestras, añadiendo 1-12% de PEG6000 en polvo a 10 g de heces secas, diluyendo la mezcla en 40 mL de agua y secándola a 60°C durante 48 h (Landau et al., 2002). La reflectancia se midió entre 1100-2500 nm y se ajustó mediante el software WinISI III. Los datos obtenidos se analizaron con el PROC MIXED para medidas repetidas de SAS (v. 9.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calibración del PEG6000 en heces mediante NIRS resultó satisfactoria ($R^2 > 0,99$; $SEC = \pm 0,2\%$) tal como se observa en la Figura 1. No se observó alteración aparente de la consistencia de las heces o de la ingestión de las ovejas por efecto del PEG, contrariamente a lo indicado por Hassoun et al. (2007). Los valores medidos y estimados de las producciones e ingestión se han resumido en la Tabla 1.

Figura 1. Calibración NIRS del contenido de PEG6000 en heces (1-12%; $n = 44$) de ovejas lecheras alimentadas en condiciones de estabulación (IN) o pastoreo (OUT).

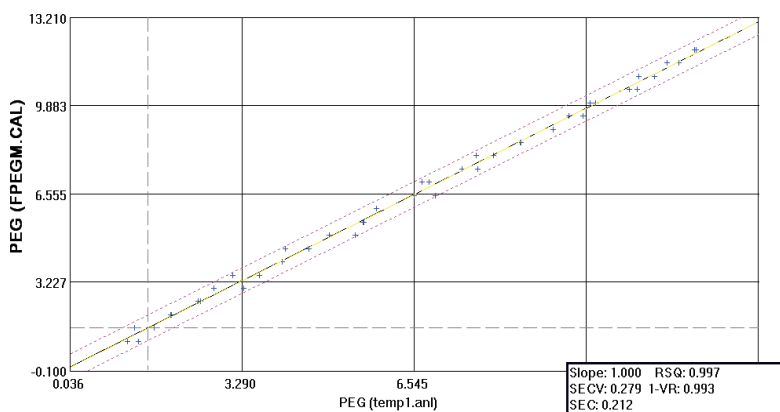


Tabla 1. Recuperación de PEG6000 en heces y estimación de la digestibilidad media de ovejas lecheras en condiciones de estabulación o de pastoreo.

Ítem	IN (estabulación)	OUT (pastoreo)	P <
Ovejas, n	6	6	-
Peso vivo, kg	74,1 ± 3,4	69,1 ± 2,0	0,035
Producción de leche, L/d	0,52 ± 0,11	0,42 ± 0,08	0,873
Grasa en leche, %	8,78 ± 0,19	8,75 ± 0,21	0,956
Leche estándar 6% ¹ , L/d	0,67 ± 0,15	0,54 ± 0,17	0,832
Ingestión ² , kg MS/d			
Concentrado	0,537 ± 0,045	0,537 ± 0,045	-
Festuca deshidratada	1,056 ± 0,086	0,580 ± 0,028	0,001
Total	1,593 ± 0,069	1,117 ± 0,035	0,001
PEG ingerido, g/d	48,5 ± 0,4	48,2 ± 0,1	0,985
Heces, g MS/d	597 ± 62	625 ± 57	0,964
PEG fecal, %	8,6 ± 0,9	6,3 ± 0,5	0,046
Recuperación PEG, %	101,2 ± 2,8	81,6 ± 5,7	0,001
Heces estimadas ³ , g MS/d	595 ± 54	626 ± 46	0,876
Digestibilidad MS media, %	62,5	-	-
Ingestión estimada ⁴ , kg MS/d	1,587 ± 0,113	-	-

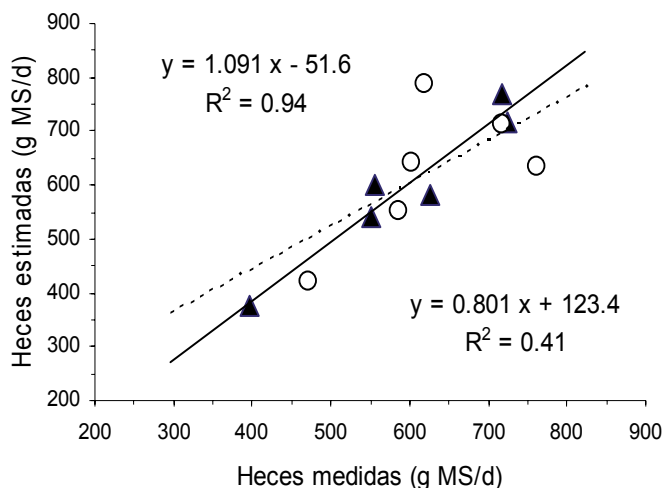
¹Molina et al. (1991); ²Valores medios del grupo de ovejas; ³Corregidas según la recuperación media de PEG para cada tipo de ración; ⁴MS ingerida = MS heces/(1-digestibilidad).

Los valores de excreción fecal de MS realmente medidos o estimados mediante el PEG se han comparado en la Figura 2. El consumo de raygrás estimado para las ovejas OUT en las 6 h de pastoreo y con una digestibilidad media de la ración del 70% (calculada a partir de tablas INRA), se estimó en aproximadamente el 46% de la MS ingerida (0,970 kg MS/d), equivalentes a 5,7 kg/d de raygrás fresco.

En conclusión, el PEG6000 resultó un marcador adecuado para estimar la excreción fecal y repartir individualmente la ingestión de MS en ovejas lecheras alimentadas con raciones

secas en grupo. La valoración de su recuperación en heces fue imprescindible en condiciones de alimentación en pastoreo, en las que el uso del PEG fue menos preciso.

Figura 2. Estimación de la excreción fecal de ovejas lecheras utilizando PEG6000 en condiciones de estabulación (IN, —▲—) o de pastoreo (OUT, --○--).



Agradecimientos: Trabajo realizado con una ayuda de la 'Fundação para a Ciência e Tecnologia' de Portugal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC, 1995. *Official methods of analysis*, Vol. I, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA
- Caja, G. 1975. *Tesis Doctoral*. ETSIA, Univ. Politécnica de Madrid, Madrid
- Chadwick V.S., Phillips S.F. & Hofman A.F. 1977. *I. Gastroenterol.* 73:241-246
- Decandia M., Sitzia M., Cabiddu A., Kababya D. & Molle G. 2000. *Small Ruminant Res.* 38:157-164
- Decandia M., Cabiddu A., Sitzia M. & Molle G. 2008. *Livest. Sci.* 116:183-190
- Hassoun P., Fabre D., Bastianelli D., Bonnal L. & Bocquier F. 2007. *Opt. Mediterran. Ser. A* 74:129-272
- Landau S., Friedman S., Devash L. & Mabeesh S.J. 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50:1374-1378
- MacRae J.C. 1974. *Proc. Nutr. Soc.* 33:147-154
- Molina M.P., Caja G., Torres A. & Gallego L. 1991. *ITEA: Prod. Anim.* 11 (vol. extra):277-279
- Schiller L.R., Santa Ana C.A., Porter J. & Fordtran J.S. 1997. *Digest. Diseases Sci.* 42:1-5
- Van Soest P.J., Robertson J.B. & Lewis B.A. 1991. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

EVALUATION OF POLYETHYLENGLYCOL (PEG6000) AS AN INDIGESTIBLE MARKER FOR DAIRY EWES FED INDOORS OR GRAZING

ABSTRACT: With the aim of estimating the individual feed intake of dairy sheep allocated in small groups, a total of 12 dairy ewes at late lactation were used. Ewes were divided in 2 groups of 6, milked twice daily and fed: 1) indoors with fescue hay ad libitum and concentrate (0.6 kg/d), or 2) grazing Italian ryegrass in early spring (6 h/d) and supplemented indoors with fescue hay ad libitum and concentrate (0.6 kg/d). Polyethylene glycol 6000 was dosed orally (48 g/d) during 10 d, measured by near infrared analysis and used as marker for estimating individual dry matter faecal excretion. Faeces were collected daily by using bags during the last 5 d. In conclusion, PEG6000 was an adequate indigestible marker to estimate faecal excretion (PEG recovery 101%), digestibility (62.4%) and total feed intake (1.587 kg DM/d) indoors. PEG recovery estimation was lower on grazing conditions (82%) being its use less accurate for feed intake estimation.

Keywords: sheep intake, intake marker, PEG, dairy sheep

COMPLEMENTACIÓN CON ENSILADOS DE MAÍZ Y HIERBA EN LA ALIMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS EN PASTOREO EN EL ALTIPLANO CENTRAL MEXICANO

Hernández-Ortega M., Heredia-Nava D., Espinoza-Ortega A., Sánchez-Vera E., Arriaga-Jordán C.M.

Centro de Investigación en Ciencias Agropecuarias (CICA) - Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Unidad San Cayetano, Carretera Toluca-Ixtlahuaca, Km 14,5. Toluca, Estado de México. C.P. 50200.

marho77@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

La producción de leche en pequeña escala (PLPE) representa una opción para el desarrollo rural en el altiplano central de México, donde la ganadería y la agricultura son fuentes importantes de ingresos para los productores de bajos recursos. La PLPE ha demostrado tener capacidad para sobrevivir en condiciones económicas difíciles, generar ingresos diarios y proporcionar oportunidades de empleo a las familias campesinas, reduciendo la pobreza y la necesidad de emigrar a las ciudades (Arriaga-Jordán *et al.*, 2002); sin embargo, los costos de alimentación del ganado son elevados, representando la mayor parte de los costos de producción, principalmente por el uso de grandes cantidades de concentrados comerciales. Se ha demostrado que el pastoreo intensivo de praderas irrigadas de raigrás perene (*Lolium perenne*) - trébol blanco (*Trifolium repens*) es una opción viable para estos productores (Heredia-Nava *et al.*, 2007), ya que el pastoreo es el recurso más barato de nutrientes y permite reducir la dependencia de insumos externos. Por otra parte, durante la época de estiaje, la complementación con forrajes conservados en la alimentación es importante para incrementar el consumo total de materia seca (MS) y el consumo relativo de energía y, al mismo tiempo, disminuir la suplementación con concentrados, lo cual tiene un efecto positivo en los costos de producción. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la complementación durante la época de estiaje con ensilados de maíz (*Zea mays*), raigrás (*Lolium perenne*) + veza de invierno (*Vicia villosa* L.) y raigrás + ebo común (*Vicia sativa* L.) en la alimentación de vacas sobre la producción y composición de leche en sistemas de PLPE en el altiplano central de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo de abril a junio de 2008 en un módulo de demostración de estrategias de alimentación para productores de leche en pequeña escala, en el Ejido San Cristóbal, Almoloya de Juárez, México; a 19°24' de LN y 99°51' LO y una altitud de 2650 m. El clima es templado sub-húmedo, con lluvias en verano y temperatura media de 15°C con precipitación promedio anual de 800 mm. Seis vacas raza Holstein-Friesian pastorearon diariamente durante ocho horas en praderas de raigrás perene (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*); se evaluaron tres estrategias de alimentación consistentes en la complementación con concentrado comercial (3,6 kg vaca⁻¹ día⁻¹, 18% PC) ofertado en fracciones iguales durante los ordeños matutino y vespertino más: T1) Ensilado de maíz (EM); T2) Ensilado de ballico anual y veza de invierno (EH-1) y T3) Ensilado de ballico anual y ebo común (EH-2). Los ensilados fueron usados tras cinco meses de su cierre y proporcionados a libre acceso después de cada ordeño de acuerdo con el tratamiento correspondiente. Las seis vacas fueron distribuidas en un diseño de cuadrado latino 3 × 3 doble de acuerdo con el número de parto y días en lactación.

El experimento consistió en 14 días de adaptación a la dieta, seguidos de siete días de control individual de producción de leche e ingestión de ensilado por diferencia entre la oferta y los rehusos. Se determinó MS de los alimentos ofertados y rehusos en estufa de aire forzado a 70°C hasta peso constante, y se molieron con criba de 1 mm para su análisis posterior. El consumo en pastoreo se determinó de manera indirecta mediante el cálculo de los requerimientos de energía de vacas lecheras de acuerdo con AFRC (1993). Las muestras de leche se obtuvieron los días 13, 16 y 19 de cada periodo experimental y se

analizaron mediante analizador ultrasónico Ekomilk en el laboratorio del Centro de Investigación en Ciencias Agropecuarias (CICA). Los resultados de ingestión, producción y composición química de la leche se compararon con el modelo estadístico: $Y_{ijkl} = \mu + C_i + V_{(i)j} + P_k + t_l + E_{ijkl}$, donde: μ = Media general; C = Efecto de cuadro, $C=1,2$; V = Efecto de vaca dentro de cuadros, $V=1,2,3$; P = Efecto debido al periodo experimental, $P=1,2,3$; t = Efecto debido al tratamiento, $P=1,2,3$; E = Error residual. El análisis de los datos se realizó mediante análisis de varianza utilizando el comando de Modelo General Lineal del programa Minitab V14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se incluyó en la dieta EM, se observaron diferencias altamente significativas ($P<0,01$) en la ingestión voluntaria de ensilado, en comparación con los tratamientos EH-1 y EH-2. Hubo diferencias significativas entre periodos experimentales ($P<0,05$), observándose un mayor consumo durante el Periodo 2. En la ingestión total de materia seca, hubo efecto ($P<0,01$) debido a tratamientos, donde el consumo total fue mayor cuando se realizó complementación con EH-1 (17,1 kg MS d^{-1}) y el consumo más bajo se obtuvo cuando se ofertó EH-2 (15,0 kg MS d^{-1}). El mayor consumo de MS en el tratamiento EH-2, se reflejó en la mayor producción de leche obtenida (18,8 kg d^{-1}), en este parámetro también se encontraron diferencias altamente significativas entre periodos y entre tratamientos ($P<0,01$).

Tabla 1. Ingestión voluntaria de materia seca (MS), producción y composición de leche en vacas lecheras en pastoreo con complementación de ensilados de acuerdo con el periodo experimental.

	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3	EEM	Periodo
MS (kg d^{-1})	16,3	16,4	16,3	0,177	NS
Ensilado (kg d^{-1})	7,2 ^b	7,7 ^a	7,3 ^b	0,159	**
Pasto (kg d^{-1})	5,5	5,1	5,3	0,155	NS
Leche (kg d^{-1})	19,3 ^a	18,2 ^b	18,1 ^b	0,224	***
SNG (g kg^{-1})	90,9 ^c	93,4 ^a	91,8 ^b	0,678	***
Grasa (g kg^{-1})	33,7	31,6	32,2	0,773	NS
Proteína (g kg^{-1})	30,8	31,8	31,2	1,838	NS

SNG: Sólidos no grasos; EEM: error estándar de la media; ^{a,b,c}: medias con letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas; NS: $P>0,10$; **: $P<0,05$; ***: $P<0,01$.

Tabla 2. Ingestión voluntaria de materia seca (MS), producción y composición de leche en vacas lecheras en pastoreo con complementación de ensilado de maíz (EM), raigrás+veza de invierno (EH-1) y raigrás+ebo común (EH-2) de acuerdo con el tratamiento.

	EM	EH-1	EH-2	EEM	Significancia
MS (kg d^{-1})	16,8 ^b	15,0 ^c	17,1 ^a	0,177	***
Ensilado (kg d^{-1})	8,8 ^a	5,6 ^c	7,8 ^b	0,159	***
Pasto (kg d^{-1})	4,4 ^b	5,8 ^a	5,7 ^a	0,155	***
Leche (kg d^{-1})	18,5 ^b	18,3 ^b	18,8 ^a	0,224	***
SNG (g kg^{-1})	92,9	91,3	91,9	0,678	NS
Grasa (g kg^{-1})	32,3	32,1	33,0	0,773	NS
Proteína (g kg^{-1})	31,6	31,0	31,2	1,838	***

SNG: Sólidos no grasos; EEM: error estándar de la media; ^{a,b,c}: medias con letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas; NS: $P>0,10$; ***: $P<0,01$.

La media total de producción de leche fue de 18,5 kg vaca⁻¹ día⁻¹, lo cual se considera satisfactorio en estos sistemas campesinos durante la época de secas, y tomando en cuenta el nivel bajo de concentrado comercial ofertado (3,6 kg vaca⁻¹ día⁻¹), estos rendimientos son similares a los reportados en ensayos de pastoreo con suplementación limitada de concentrados en la región (Arriaga-Jordán *et al.*, 2002) o en otras latitudes (Phillips and James, 1998; Hargreaves *et al.*, 2001), aunque en estos casos con vacas de mayor peso y en periodos más largos. En cuanto a producción de leche, EH-2 fue la mejor estrategia (P<0,01), pero a nivel de consumo de ensilado no fue el que presentó los valores más altos; sin embargo, en esta estrategia se observó el mayor consumo total de MS (P<0,01).

En general, la complementación con forrajes ensilados permitió mantener el consumo total de MS, así como un nivel bajo de complementación con concentrado comercial, lo cual tiene un efecto positivo en los costos de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRC - Animal and Food Research Council. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, UK.
- Arriaga-Jordán C.M., Albarran-Portillo B., Espinoza-Ortega A., García-Martínez A., Castelán-Ortega O.A. 2002. On-farm comparison of feeding strategies based on forages for small-scale dairy production systems in the Highlands of Central Mexico, *Experimental Agriculture*. 38:375–388.
- Heredia-Nava D., Espinoza-Ortega A., González-Esquivel C.E., Arriaga-Jordán C.M. 2007. Feeding strategies for small-scale dairy systems based on perennial (*Lolium perenne*) or annual (*Lolium multiflorum*) ryegrass in the central highlands of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*. 39:179–188.
- Hargreaves A., Strauch O. Teuber N. 2001. Efecto de la carga animal y de la suplementación reguladora a vacas lecheras en primavera y verano sobre la producción de leche. *Ciencia e Investigación Agraria*. 28: 89–102.
- Phillips C.J.C., James N.L., 1998. The effects of including white clover in perennial ryegrass swards and the height of mixed swards on the milk production, sward selection and ingestive behaviour of dairy cows. *Animal Science*. 67:195–202.

SUPPLEMENTATION WITH MAIZE AND HERBAGE SILAGES ON GRAZING LACTATING DAIRY COWS IN THE HIGHLANDS OF CENTRAL MEXICO

ABSTRACT: Small-scale dairying is an option for *campesinos* in Mexico. The costs of feeding are high and strategies based on good quality forages are a priority. The aim of this experiment was to determinate the effect of supplementation grazing cows with three types of forage silages and one commercial concentrate. T1: maize silage (MS), T2: ryegrass (*Lolium perenne*) + wolly pod vetch (*Vicia villosa*, SH-1) silage, and T3: ryegrass + common vetch (*Vicia sativa*, HS-2) silage, on milk yield (MY) and milk composition (MC) of dairy cows on Small-scale dairy farming in the highlands of Central Mexico. A double 3×3 Latin Square experimental design was carried out with 6 cows with 3 week periods of 21 days each. Cows grazed continuously on a ryegrass and white clover sward and were supplemented with 3,6 kg DM day⁻¹ of concentrate (18% CP). Silage was offered *ad libitum*. MY, MC, live-weight, body condition score, concentrate and silage intake were recorded. Herbage DM intake was estimated indirectly. MY on MS (18,8 kg cow⁻¹ d⁻¹) was higher (P<0,01) than on HS-1 and HS-2. Silage intake was higher (P<0,01) on SM than on HS-1 and HS-2. Total DM intake on HS-2 was higher than on SM and HS-1 (P<0,01).

Keywords: *Supplementation, maize silage, herbage silage, grazing dairy cows.*

CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL RUMEN ASOCIADOS AL CONSUMO DE HOJAS JOVENES DE ROBLE (*QUERCUS PYRENAICA*) Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA APARICION DE INTOXICACIONES EN GANADO VACUNO

Belenguer, A.¹, Hervás, G.¹, Doce, R.R.¹, Yáñez-Ruiz, D.R.², Santos N.¹, Mantecón, A.R.¹ y Frutos P.¹

¹Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León.
A.Belenguer@eae.csic.es. ²Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Camino del jueves s/n, 18100 Armilla, Granada.

INTRODUCCIÓN

En las zonas de media montaña de nuestro país, el ganado vacuno presenta con frecuencia intoxicaciones asociadas a la ingestión de cantidades elevadas de hojas jóvenes de roble (*Quercus pyrenaica*) en primavera, cuando la disponibilidad de pasto es baja. Dichas hojas jóvenes son ricas en taninos hidrolizables (TH) que parecen ser los responsables de las intoxicaciones. Además, estos taninos afectan al crecimiento de diversas comunidades microbianas del rumen, aunque también se han descrito algunas capaces de resistir e incluso metabolizar los TH (Smith et al., 2005). El metabolismo microbiano de los TH es un mecanismo de protección de los microorganismos, que los convierten en compuestos inocuos para ellos. Aunque algunos metabolitos (ácido gálico, pirogalol) pueden ser también tóxicos para el animal, otros son inofensivos (resorcinol, floroglucinol) e incluso sustancias beneficiosas (ácidos acético y butírico). Por tanto, los microorganismos del rumen podrían desempeñar un papel fundamental tanto en la aparición de intoxicaciones por la ingestión de hojas jóvenes de roble como en su prevención, gracias a su actividad metabólica.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de hojas jóvenes de roble, ricas en TH, sobre las comunidades microbianas del rumen e investigar una posible relación entre ciertos grupos bacterianos y la aparición o no de las intoxicaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primavera, se recogieron hojas muy jóvenes (HR) de una zona de bardales de roble melojo (*Quercus pyrenaica*) y se congelaron a -30°C hasta el experimento. Su contenido de taninos totales fue 230 g de equivalentes de ácido tánico/kg de materia seca (MS) y de ácidos gálico y elágico, 19 y 11 g/kg MS, respectivamente (Doce et al., 2008).

Tres erales de raza parda (aprox. 1,8 años de edad, 498 ± 22,2 kg de PV inicial), canulados en el rumen y estabulados individualmente, fueron alimentados durante un periodo de adaptación de 10 días con 5 kg diarios de MS de heno de hierba. Posteriormente fueron sometidos a un periodo de restricción severa del alimento (simulando la situación de escasez a la que se enfrentan los animales en condiciones reales cuando consumen las HR; días -8 a -1): 4 kg MS de heno durante dos días, 3 kg durante un día, 2 kg durante los siguientes cuatro días y finalmente un día de ayuno. A continuación se comenzó la administración de las HR, junto con el heno: 14 g MS de heno más 14 g MS de HR/kg PV^{0.75} (de media 1,7 kg de heno y 5 kg de HR, en fresco) durante 6 días consecutivos (días 1 a 6). El heno se ofertó en una sola toma, a las 9.00 h. En cambio, las HR, descongeladas y troceadas ligeramente, se administraron en dos tomas (aproximadamente a las 8.30 y 20.00 h), a través de la cánula ruminal, para asegurar que todos los animales recibían la cantidad establecida. A partir del día 7, los erales recibieron la misma cantidad de heno que en el periodo de adaptación durante 12 días más (días 7 a 18) hasta que fueron eutanasiados.

Se tomaron muestras del contenido ruminal para la extracción de ADN microbiano antes de la restricción de alimento (día -10), inmediatamente después de esta (día 1), tras 2 y 5 días del comienzo de la administración de las HR (días 3 y 6), y 4 y 12 días después de finalizar dicha administración (días 10 y 18). El contenido ruminal fue congelado inmediatamente a -80°C. Además, aproximadamente cada dos días se recogieron muestras de sangre para analizar la concentración de urea y creatinina en el plasma mediante espectrofotometría.

El ADN microbiano del contenido ruminal liofilizado fue extraído siguiendo una modificación del protocolo descrito por Yu y Morrison (2004), purificado para eliminar restos de taninos, que pueden inhibir la PCR, y analizado mediante la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (tRFLP). Para ello el ADN fue amplificado mediante PCR utilizando cebadores específicos para bacterias, estando uno de ellos marcado con fluorescencia. El producto de la PCR fue purificado y a continuación digerido utilizando un

enzima de restricción (HhaI). Los productos de dicha digestión fueron purificados y los fragmentos se analizaron en un secuenciador capilar automático. El perfil de picos obtenido mediante tRFLP fue analizado mediante el programa *GeneMarker* (Softgenetics, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta experimental a la administración de las HR fue muy variable. El animal 1 no mostró signos de intoxicación en ningún momento. Por su parte, los animales 2 y 3 mostraron debilidad, anorexia y depresión a los dos o tres días de la administración de las HR. Además, la motilidad ruminal disminuyó y aparecieron diarrea y constipación. Se produjo un descenso muy marcado de la ingestión (Figura 1) y una severa oliguria. En las intoxicaciones por TH el principal órgano diana es el riñón, lo que explicaría el incremento en los niveles de urea y creatinina plasmáticas en los animales intoxicados (Figura 1). Sin embargo, el animal 3 comenzó a mostrar signos de recuperación aproximadamente una semana después de interrumpir la administración de las HR, como reflejan la mayor ingestión de heno y el descenso de las concentraciones de urea y creatinina a niveles normales (Figura 1). Tras la eutanasia, sólo el animal 2 presentaba lesiones importantes en los riñones y el aparato digestivo, caracterizadas principalmente por nefromegalia y lesiones ulcerosas en la mucosa oral, el esófago, los preestómagos y el abomaso.

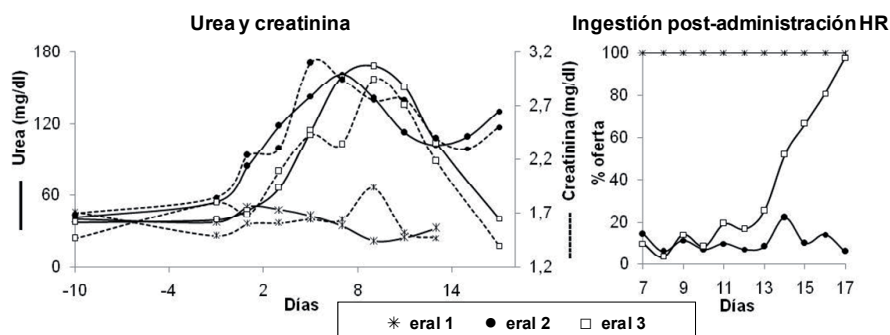


Figura 1. Concentraciones de urea (línea sólida; mg/dl) y creatinina (línea discontinua; mg/dl) en el plasma a lo largo del experimento e ingestión de heno (% de la oferta) post-administración de las HR, en los tres erales utilizados.

Los resultados obtenidos mediante tRFLP se utilizaron para construir el dendrograma que se presenta en la Figura 2, donde se puede observar un claro agrupamiento de los perfiles microbianos de las muestras del animal 1, que no se intoxicó, junto con el de la muestra del animal 3 tras su recuperación. Por otra parte, se aprecia un segundo grupo, con el resto de las muestras, en el que a su vez las iniciales de los erales 2 y 3 se sitúan de forma separada a las obtenidas durante la intoxicación aguda. Las diferencias en la composición microbiana, posibles determinantes del efecto de la ingestión de las HR, podrían deberse a comunidades capaces de metabolizar los TH, como algunas especies del género *Streptococcus* (Goel et al., 2005), cuya abundancia era superior en los animales intoxicados inicialmente y tras la administración de las HR (Belenguer et al., 2008). Además, en los erales intoxicados, que presentaban HR en el rumen incluso tras finalizar su administración, y especialmente en el animal 2, los perfiles microbianos obtenidos mediante tRFLP revelan un incremento significativo de fragmentos que podrían corresponder a especies bacterianas pertenecientes a las divisiones *Proteobacteria*, tras el comienzo de la administración de las HR, y *Actinobacteria*, tras interrumpir dicha administración. Algunas bacterias de ambos grupos parecen ser resistentes a los taninos (Jones et al., 1994; Bhat et al., 1998) e incluso determinadas especies pueden degradarlos hasta pirogalol (Odenyo et al., 2001), por lo que podrían estar relacionadas con la presencia de HR en el rumen o con las intoxicaciones. La composición microbiana del rumen podría ser uno de los factores clave que determina la respuesta del ganado vacuno a la ingestión de productos ricos en TH, como las hojas jóvenes de roble. Sin embargo, la identificación y confirmación de los principales

microorganismos responsables del metabolismo de los TH y de su implicación en la intoxicación o en su prevención exige más estudios de este tipo del ecosistema ruminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer, A., Hervás, G., Paz, P., Ezquerro, C. & Frutos, P. 2008. Proceedings of the 6th INRA-RRI Symposium: Gut microbiome, 27, Clermont-Ferrand, Francia.
- Bhat, T. K., Singh, B. & Sharma, O. P. 1998. *Biodeg.* 9: 343-357.
- Doce, R. R., Hervás, G., Belenguer, A., Toral, P. G., Giráldez, F. J. & Frutos, P. 2008. *Anim. Feed Sci. Technol.* (en prensa).
- Goel, G., Puniya, A. K., Aguilar, C. N. & Singh, K. 2005. *Naturwiss.* 92: 497-503.
- Jones, G. A., McAllister, T. A., Muir, A. D. & Cheng, K. J. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1374-1378.
- Odenyo A. A., Bishop R., Asefa G., Jamnadass R., Odongo D. & Osuji P. 2001. *Anaerobe* 7: 5-15.
- Smith, A. H., Zoetendal, E. & Mackie, R. I. 2005. *Microbial Ecol.* 50: 197-205.
- Yu, Z. & Morrison, M. 2004. *BioTechniques* 36: 808-812.

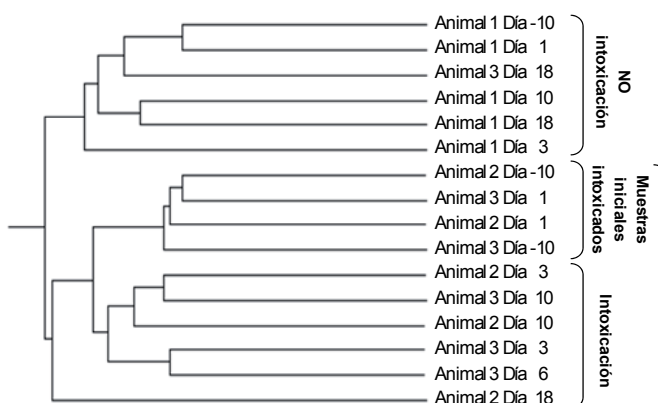


Figura 2. Dendrograma obtenido mediante tRFLP a partir de las muestras tomadas de los tres erales a lo largo del experimento.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC; Proyecto AGL2004-06076-C02-01). A. Belenguer ha disfrutado de un contrato postdoctoral del programa I3P del CSIC y R.R. Doce de una beca predoctoral del MEC.

CHANGES IN THE RUMEN BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE CONSUMPTION OF YOUNG OAK (*QUERCUS PYRENAICA*) LEAVES AND THEIR POSSIBLE RELATIONSHIP WITH INTOXICATIONS IN CATTLE

ABSTRACT: Intoxication of grazing cattle occurs repeatedly when they consume large amounts of young oak (*Quercus pyrenaica*) leaves (OL), that are rich in hydrolysable tannins (HT). In order to study the effect of the administration of HT-rich OL on the rumen bacterial communities and investigate a possible relationship between these and the intoxications, three ruminally cannulated bulls were subjected to a severe feed restriction period, before receiving OL for 6 days. Then, they were offered grass hay for 12 more days. Rumen contents were sampled throughout the experiment and terminal restriction fragment polymorphism (tRFLP) were used to monitor the bacterial dynamics. Animal 1 was not intoxicated, whereas animals 2 and 3 showed acute signs of intoxication with the OL administration. However, animal 3 presented signs of recovery approximately one week after stopping the OL administration. The microbial profiles of animal 1 clustered separately from animals 2 and 3, except for the sample from animal 3 on day 18, when this animal was recovered. These results suggest that individual composition of the rumen microbiota might be a key factor in determining the effect of the consumption of HT-rich OL in grazing ruminants.

Keywords: hydrolysable tannin, rumen bacteria, intoxication, molecular technique.

UTILIZACIÓN DE UN SISTEMA DE ALIMENTACIÓN MECANIZADO EN OVINO DE CARNE: I.- EFECTO SOBRE EL CONSUMO Y LOS COSTES DE ALIMENTACIÓN

J.A. Miguel¹, J.L. Calvo^{1,2}, J. Ciria¹ y B. Asenjo¹

¹Área de Producción Animal. E.U. de Ingenierías Agrarias de Soria (Universidad de Valladolid). Campus Duques de Soria s/n. 42004 (Soria)

²Serv. Agropecuarios de la Excm. Diputación Provincial de Soria. C/Caballeros, 17. 42002 (Soria)

basenjo@agro.uva.es

INTRODUCCIÓN

Últimamente, las explotaciones extensivas de ovino de carne presentan escasa rentabilidad, lo que hace peligrar su viabilidad y su permanencia como empresa. Mientras que las directrices Comunitarias impulsan la extensificación, la realidad muestra un claro retroceso del papel que juega el pastoreo en la alimentación del ganado ovino ya que una de las características que mejor definen los sistemas de pastoreo frente a otras formas de explotación es la dependencia de los recursos vegetales y las variaciones de disponibilidad de estos a lo largo del año así como la estrecha dependencia animal-hombre.

La explotación tradicional extensiva se encuentra en una fase de regresión derivada de tres causas: mano de obra (estrecha dependencia hombre-animal); alimentación (raciones complementarias costosas y distribución gravosa) y escasa productividad numérica. La alimentación supone una parte importante de los costes de producción, pues en general, en la época de máximas necesidades y/o de mínima disponibilidad de recursos pastables, el ganadero recurre a la suplementación a base de concentrados y henos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se realizó con ovejas de raza Ojalada en la explotación del Campo Agropecuario de San Esteban de Gormaz, perteneciente a la Exma. Diputación Provincial de Soria. En octubre de 2007 se formaron dos lotes al azar con 20 ovejas/lote de entre 2 y 8 años. Dado que en dicha explotación se sigue el sistema de 3 partos en 2 años y no se lleva a cabo ningún tratamiento hormonal de inducción y sincronización de celos, se realizaron dos parideras, una en mayo de 2008 y otra en febrero de 2009.

Los dos lotes se establecieron en función de los dos sistemas de alimentación a comparar:

- **LOTE 1.-** Paja de cereal picada y molida (fibra corta) distribuida de forma mecanizada y suministrada *ad libitum*.
- **LOTE 2.-** Ración completa en forma de pacones *ad libitum* (fibra larga).

Las ovejas permanecieron estabuladas con una superficie de 1,5 m²/animal durante todo el periodo experimental, disponiendo de un patio de ejercicio al aire libre de 50 m² por lote.

En las épocas de cubrición (10 de diciembre de 2007 y 16 de septiembre de 2008), se incorporó un macho en cada lote, permaneciendo con las ovejas durante 45.

El componente principal de la ración fue la paja de cereal, picada para el Lote 1 y entera en el Lote 2. Como complemento a la paja se incorporó mezclado, de manera que no era posible la selección por parte de los animales, un mismo concentrado en ambos lotes, cuya composición (tabla 1) así como la proporción de paja, variaba en función de la fase productiva:

- a) mantenimiento y dos primeros tercios de la gestación: 80% paja y 20% concentrado (0,48 UFL y 42,26 g de PDI/kg de alimento elaborado)
- b) final de gestación y lactación: 50% paja y 50% concentrado (0,64 UFL y 69,45 g de PDI/kg de alimento elaborado)

El consumo se evaluó teniendo en cuenta la cantidad de alimento que era suministrado, sin

Tabla 1. Composición en materias primas y composición química del concentrado en función de la fase productiva.

Materias primas (%)	Mantenimiento- dos primeros tercios de gestación	Final gestación- lactación
Cebada	48,5	46,0
Harina Girasol 30 %	30,0	30,0
DDGS Maíz	15,00	-
DDGS Sorgo	-	15,00
Melaza Caña	4,0	4,0
Sal	0,5	0,5
Fosfato Bicalcico	1,0	0,4
Carbonato Cálcico	-	1,1
Jabón Cálcico	-	2,0
Bicarbonato Sódico	0,5	0,5
Óxido Magnesio	0,2	0,2
Microcorrector	0,3	0,3
Composición Química (%)		
Materia Seca (MS)	89,41	89,81
Materia Orgánica (MO)	95,68	95,87
Proteína Bruta (PB)	18,47	19,05
Fibra Neutrodetergente (FND)	26,93	24,77

Para el Lote 1, la paja era picada y molida en la propia explotación, donde también se incorporaba el concentrado pasando todo a una mezcladora para ser distribuida a libre disposición, a través de tubos de conducción desde el almacén hasta las tolvas de alimentación. A las ovejas del Lote 2, se les ofrecía el mismo alimento en forma de pacones de unos 450 kg elaborados por una empresa concertada y eran depositados en un comedero tipo come rum.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Consumo medio diario (kg/oveja y día), coste del kg (€), número de días por periodo y coste total de la alimentación (€) calculada para un periodo de un año (1 de octubre a 30 de septiembre) en función del sistema de alimentación.

		Consumo medio diario	Coste kg	Nº días por periodo	Coste medio por periodo	Coste total anual por animal
LOTE 1	Mantenimiento- dos primeros tercios de gestación	1,43	0,092	268	35,25	78,47
	Final gestación- lactación	2,41	0,183	98	43,22	
LOTE 2	Mantenimiento- dos primeros tercios de gestación	1,49	0,112	272	45,39	85,79
	Final gestación- lactación	2,16	0,199	94	40,40	

La principal diferencia de consumo entre los dos lotes se observa en el último tercio de la gestación y lactación siendo un 11,5% superior en el Lote 1 que en Lote 2 (2,41 kg/oveja/día vs. 2,16). En el periodo de mantenimiento y los dos primeros tercios de gestación, si bien el consumo es superior en el Lote 2, la diferencia no es tan acusada con respecto al Lote 1

(1,49 kg/oveja/día vs. 1,43). Esto unido al mayor coste del kg de la ración del Lote 2 hace que el coste anual de la alimentación sea un 9,3% superior en el Lote 2 que en el Lote 1 (85,79 euros vs. 78,47).

Fantova et al. (2007) comparando el coste de la alimentación de ovejas de carne en diferentes explotaciones aragonesas, encontraron valores que iban desde los 35 €/oveja y año para aquéllas de menor nivel de intensificación, hasta los 63 €/oveja y año para las de más intensificadas. Pardos et al. (2007), en un trabajo de similares características, obtuvieron costes de 38,46 a 56,20 €/oveja y año, para las explotaciones más y menos intensificadas, respectivamente. Ambos resultados son inferiores a los encontrados en este trabajo, pero hay que tener en cuenta que aquellos se realizaron con datos económicos de 2004, frente a los datos de 2008 que aquí presentamos. Valores más en la línea de los obtenidos en este estudio, son los estimados por ASAJA (2007) de 71,3 €/oveja y año, calculados con datos económicos de 2007.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASAJA. 2007. Plan de Choque para el Sector Ovino.
En: <http://www.asajaclm.org/documentos/plandechoque.doc>
- Fantova, E., Bru, CH., Buñuel, M., Santander, L., Moreno, J. y Pardos, L. 2007. Influencia del coste de alimentación y la productividad por oveja en los resultados económicos de explotaciones ovinas de carne en Aragón. XXXII Jornadas de la SEOC, 117-120.
- Pardos, L. Y Fantova, E. 2007. Importancia del control de gestión técnico-económico en las ganaderías de ovino de carne. En: Producción de ovino de carne en medio semiárido. Ed. Grupo Consolidado de Investigación Aplicada sobre Producción de ovino de Carne- Gobierno de Aragón.

USING OF A MECHANIZED FEED SYSTEM IN EWES OF MEAT: II. - EFFECT ON THE CONSUMPTION AND THE COSTS OF FEED

SUMMARY: Forty adult ewes of Ojalada breed were randomly allocated in two groups (n= 20) according to two feeding systems: an integral diet based on ground straw of cereal (group 1), and other one based on an integral diet in form of big bales of hay (group 2). Ewes remained indoors. In each one of the systems, was evaluated the intake along the different physiological conditions.

The principal difference in intake is observed in the last third of pregnancy and lactation, being 11.5 % more in group 1 than in group 2 (2.41 kg / sheep / day vs. 2.16). In the period of maintenance and the first two thirds of gestation, though the consumption is higher in the group 2, the difference is smaller with regard to the group 1 (1.49 kg / sheep / day vs. 1.43). In spite of the higher consumption in the group 1, the feeding costs are lower in group 2 due to the major cost of the portion in the latter, which leads to the annual feeding costs being 9,3 higher % in the group 2 than in the group 1 (85.79 Euros vs. 78.47).

Keywords: *integral diet, meat sheep, cost, local breed.*

UTILIZACIÓN DE UN SISTEMA DE ALIMENTACIÓN MECANIZADO EN OVINO DE CARNE: II. EFECTO SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL PESO DE LAS OVEJAS EN DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS

Asenjo¹, B., Calvo^{1,2}, J.L., Ciria¹, J. y Miguel¹, J.A.

¹Área de Producción Animal. E.U. de Ingenierías Agrarias de Soria (Universidad de Valladolid). Campus Duques de Soria, s/n. 42004 (Soria)

²Serv. Agropecuarios de la Excm. Diputación Provincial de Soria. C/Caballeros, 17. 42002 basenjo@agro.uva.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la Política Agraria Comunitaria trata de incentivar la utilización de sistemas extensivos de producción animal por su incidencia socioeconómica y medioambiental. Tradicionalmente, Ésta ha sido la forma más habitual de explotación del ganado ovino de carne en la geografía nacional, pero en los últimos años se encuentra en franco retroceso, pues se trata de un sistema de explotación donde la figura del hombre se hace del todo imprescindible, siendo evidente que cada vez son menos las explotaciones que sobreviven de esta forma. Ante esta situación caben distintas soluciones técnicas aunque no todas ellas aplicables en la práctica dada la escasa rentabilidad así como la carencia de infraestructuras en las explotaciones. Por ello, se precisa diseñar un modelo ajustado a las condiciones particulares de explotaciones situadas en zonas cerealistas, orientado a la mejora de la calidad de vida rompiendo la estrecha dependencia existente entre ganadero y animal mediante la distribución mecanizada de alimentos conservados en determinadas épocas del año (invierno), en fases productivas de final de gestación y lactación o bien por conveniencia del ganadero con motivo de vacaciones, fines de semana o enfermedad.

El presente trabajo es parte de un proyecto más amplio y se pretende evaluar la puesta a punto de dos sistemas de alimentación a base de subproductos (paja de cereal) así como su forma de presentación (fibra corta-larga) y distribución mecanizada.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño experimental aparece descrito en la anterior comunicación (Miguel et al., 2009) teniendo en cuenta que ahora también se compara con el sistema de alimentación tradicional (LOTE 3): pastoreo y suplementación con concentrado dependiendo de la época del año y del estado fisiológico, de la misma composición que el de los lotes 1 y 2. Las ovejas de este lote 3 permanecieron con el rebaño siguiendo el manejo tradicional.

Las ovejas se pesaron de forma individual una vez al mes y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un modelo lineal general de análisis de varianza del programa informático SPSS versión 10.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 y en la Figura 1 se recoge la evolución de los pesos de las ovejas de los tres lotes, en función del tipo de alimentación y del tipo de ración dependiendo del estado fisiológico de los animales (ovejas vacías-inicio de la gestación o final de la gestación-lactación).

No se observan diferencias significativas en los tres lotes, tanto en el peso vivo inicial como la evolución de pesos durante el periodo que fueron alimentadas las ovejas de los lotes 1 y 2 con la ración de mantenimiento. Sin embargo, sí se encuentran diferencias ($p < 0,001$) en la etapa del final de gestación y de la lactación, presentando los pesos más bajos las del lote 2 durante todo este periodo. Se observa además, como en la primera mitad de esta etapa, que coincide con la fase previa al parto, son las ovejas del lote 3 las que presentan los mayores pesos y sin embargo en la segunda mitad (final de lactación) son las del lote 1 las

más pesadas. Esta situación se mantiene aún cuando se vuelve a la ración de mantenimiento después de la lactación.

Durante la siguiente etapa (mantenimiento y dos primeros tercios de gestación) siguen siendo las ovejas del lote 2 las que menos pesan ($p < 0,001$ en la primera mitad y $p < 0,05$ en la segunda), mientras que las de los lotes 1 y 3 presentan la misma tendencia, superada por las del lote 1 al inicio de este periodo y por las del lote 3 al final coincidiendo con la nueva cubrición de estas.

Tabla 1. Medias del peso vivo de las ovejas (en kg) en función del sistema de alimentación y del estado fisiológico.

		LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	SIG
Mantenimiento- dos primeros tercios de gestación	Octubre 07	62,87	61,80	60,90	n.s.
	Nov. 07	64,42	60,52	60,45	n.s.
	Diciembre 07 (cub)	63,89	60,15	60,80	n.s.
	Enero 08	62,44	58,95	59,70	n.s.
	Febrero 08	60,39	57,50	59,32	n.s.
	Marzo 08	59,18	55,79	62,10	n.s.
Final Gestación- Lactación	Abril 08	57,92 ^{ab}	51,26 ^b	62,22 ^a	**
	Mayo 08 (partos)	63,86	59,26	66,94	n.s.
	Junio 08	60,76 ^a	50,76 ^b	59,06 ^a	*
	Julio 08 (fin lact)	64,76 ^a	51,29 ^b	58,19 ^{ab}	**
Mantenimiento- dos primeros tercios de gestación	Agosto 08	60,92 ^a	49,72 ^b	54,96 ^{ab}	**
	Septiembre 08	59,10 ^a	49,78 ^b	58,28 ^a	**
	Octubre 08	58,59 ^a	50,75 ^b	60,50 ^a	*
	Noviembre 08	58,12 ^a	49,64 ^b	58,75 ^a	*
	Diciembre 08	59,13 ^{ab}	51,718 ^b	62,66 ^a	*

n.s.: No significativo; * Diferencias significativas ($p < 0,05$); ** Diferencias significativas ($p < 0,001$)
Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipos genéticos para $p < 0,05$

Como se puede observar en la figura 1, las ovejas del lote 3 presentan, en conjunto, el comportamiento esperado, con aumento de peso desde la cubrición hasta el parto y descenso durante y después de la lactación para posteriormente recuperarlo, pudiendo deberse esta pérdida de peso después de la lactación, en las primeras semanas de pastoreo, al vaciado del contenido digestivo al pasar de una dieta seca a verde (INRA, 1978), hecho este observado también en ovejas de raza Churra Tensina (Joy et al., 2007). Las ovejas de los lotes 1 y 2, si bien presentan pérdida de peso a partir de la cubrición, tal vez originado por la adaptación a la estabulación, en el lote 1 cabe destacar el aumento de peso que experimentan coincidiendo con el final de la lactación. Este último hecho ha sido observado en ovejas de raza Churra Tensina estabuladas durante el período de cría y alimentadas con una mezcla completa (Joy et al., 2007). En nuestro estudio, puede explicarse debido al mayor consumo por parte de las ovejas del lote 1 con respecto a las del lote 2 en esta etapa (2,41 kg/oveja/día vs 2,16 kg/oveja/día, respectivamente).

A tenor de los resultados obtenidos, se aprecia que de las ovejas que permanecen en estabulación (lotes 1 y 2) son las del lote 1 las que mejor comportamiento presentan, teniendo en cuenta algunas observaciones realizadas en los animales como el mayor desperdicio de alimento en las ovejas del lote 2 y el peor aspecto general de estas (animales menos vigorosos y lana en mal estado).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Institut National de la Recherche Agronomique. 1978. Alimentation des ruminants. R Jarrigue (Ed.). INRA Publications, Versailles.
Joy, M., Álvarez-Rodríguez, J., Ferrer, J. & Sanz, A. 2007. pR 8, núm. 2: 8-15.
Miguel, J.A., Calvo, J.L., Ciria, J. & Asenjo, B. 2009. XIII Jornadas sobre Producción Animal.

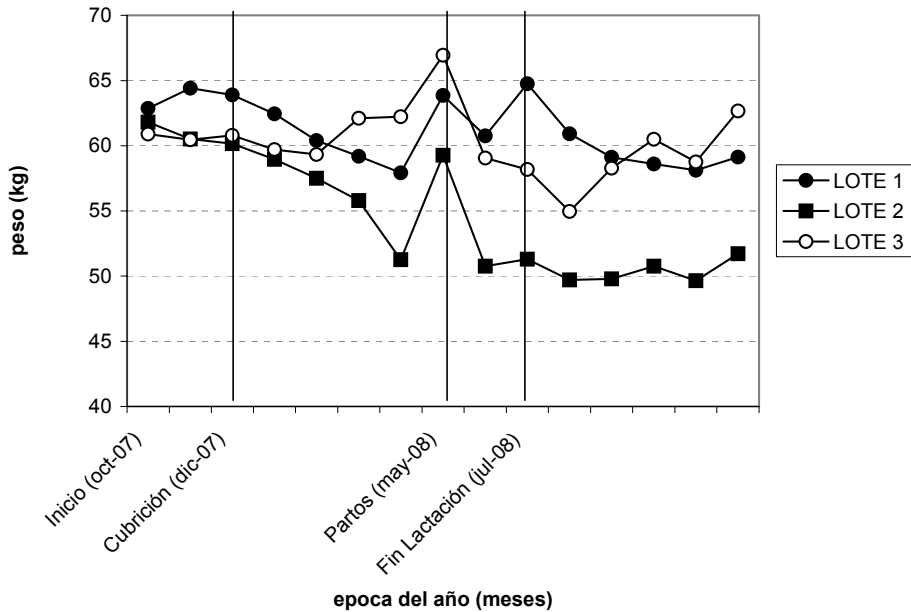


Figura 1. Evolución del peso de las ovejas en función del sistema de alimentación y del estado fisiológico.

USING OF A MECHANIZED FEED SYTEM IN EWES OF MEAT: II. EFFECT ON THE WEIGHT EVOLUTION OF THE EWES IN DIFFERENT PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

SUMMARY: Sixty adult ewes of Ojalada breed were randomly allocated to three groups ($n=20$) according to three feeding and management systems: an integral diet based on ground straw of cereal (group 1), other one based on an integral diet in large bales of hay (group 2) and the traditional grazing (group 3). Ewes of groups 1 and 2 remained indoors. In each one of the three systems, the evolution of weight (monthly) along the different physiological conditions was evaluated.

The sheep of group 3 present, as a whole, the expected performance, with increase of weight from mating to lambing, decrease during the lactation and recovery afterwards. The sheep of the groups 1 and 2 lost weight from mating, maybe originated by the adjustment to the indoors system, but in group 1 they recover their initial weight by the end of the lactation. Sheep of group 2 are those who present worse performance along the whole study.

Keywords: feeding, live- weight, sheep, local breed.



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:

- 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
- 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

Tomo I (2009)

AIDA

Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

www.aida-itea.org

