

ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO (AIDA)

42 JORNADAS DE ESTUDIO

XV JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL

14 y 15 de mayo de 2013

Zaragoza

TOMO II

COLABORAN:

Gobierno de Aragón

Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Regional

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA)

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA)

Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (IAMZ)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)



www.aida-itea.org

Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Título: XV Jornadas sobre Producción Animal

Edita: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Textos: Autores

Colección: Congresos y Jornadas

Serie: Producción Animal

Editores:

Jorge Hugo Calvo Lacosta

Isabel Casasús Pueyo

Margalida Joy Torrens

Javier Álvarez Rodríguez

Luis Varona Aguado

Begoña Panea Doblao

Carlos Calvete Margolles

Joaquim Balcells Teres

Secretario administrativo: Joaquín Moreno Miguel

Foto portada: Isabel Casasús Pueyo

XV Jornadas sobre Producción Animal Tomo II	DIRECCIÓN Y REDACCIÓN Montañana, 930 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA (ESPAÑA)	ISBN Tomo II: 978-84-695-7685-4 Depósito legal: Z-866-2013 Imprime: INO Reproducciones, S.A.
---	--	--

**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**

COLABORADORES:



Fondo Europeo
Agrícola de
Desarrollo Rural



PATROCINADORES:



ÍNDICE

TOMO II

GENÉTICA

Genética: Mejora Genética de Rumiantes

- LA FORMACIÓN DE LAS RAZAS AUTÓCTONAS ESPAÑOLAS DE GANADO VACUNO. Alenda, R., Jiménez-Montero, J. A. 445
- OBJETIVOS DE SELECCIÓN EN VACUNO DE CARNE EN FUNCIÓN DE SUS REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS Y DE LA DISPONIBILIDAD DE PASTO. de Paz-del Río, R., Jiménez-Montero, J.A., Daza, A., Alenda, R. 448
- ESTRÉS TÉRMICO EN RAZAS AUTÓCTONAS DE RUMIANTES LECHEROS. Carabaño, M.J., Ramón, M., Abo-Shady, H.M., Pérez-Guzmán, M.D., Serrano, M., Díaz, C., Molina, A., Menéndez-Buxadera, A., Bahchaga, K., Pérez-Cabal M.A., Serradilla, J.M. 451
- RELACIÓN ENTRE VIDA PRODUCTIVA Y EDAD AL PRIMER PARTO EN OVEJAS DE LECHE Y CARNE. Jurado, J.J., Jiménez, M.A. 454

Genética: Mejora Genética de Conejos

- SELECCIÓN POR TASA DE OVULACIÓN Y TAMAÑO DE CAMADA EN CONEJO. ESTIMACIÓN DE LA RESPUESTA A LA SELECCIÓN. Badawy, A.Y., Peiró, R., Mocé, M.L., Blasco, A., Santacreu, M.A. 457
- RESPUESTAS EN SELECCIÓN DIVERGENTE POR VARIANZA AMBIENTAL DEL TAMAÑO DE CAMADA EN CONEJO. Martínez-Álvaro, M., Ibáñez-Escriche, N., Argente, M.J., García, M.L., Blasco, A. 460
- EFECTO DE LA SELECCIÓN POR VARIANZA RESIDUAL DEL TAMAÑO DE CAMADA SOBRE LOS COMPONENTES DEL TAMAÑO DE CAMADA Y EL PESO DEL GAZAPO AL NACIMIENTO. Sánchez, D., Esclapez, A., Argente, M.J., Garcia, M.L., Muelas, R., Blasco, A. 463
- SELECCIÓN DIVERGENTE POR GRASA INTRAMUSCULAR EN CONEJO. RESPUESTA DIRECTA A LA SELECCIÓN. Zomeño, C., Hernández, P., Blasco, A. 466
- HETEROGENEIDAD GENÉTICA DE LA LONGEVIDAD FUNCIONAL EN CINCO LÍNEAS DE CONEJOS. EL Nagar, A. G., Sánchez, J. P., Mínguez, C., Baselga, M. . . 469
- INTERACCIÓN Gx ϵ PARA PESO POST-DESTETE EN CONEJO DE CARNE ENTRE REGÍMENES DE ALIMENTACIÓN *AD LIBITUM* Y RESTRINGIDA. Piles, M., Ramon, J., Rafel, O., Sánchez, J. P. 472
- COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE EN TRES LÍNEAS MATERNALES DE CONEJOS. EL Nagar, A. G., Ragab, M., Mínguez, C., Sánchez, J. P., Baselga, M. 475
- COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE SACRIFICIO EN CONEJOS CRUZADOS PROCEDENTES DE CUATRO LÍNEAS MATERNALES. Mínguez, C., Gutiérrez-Valcárcel, A., Sánchez, J. P., EL Nagar A.G., Ragab, M., Baselga, M. 478
- PARÁMETROS GENÉTICOS DE LA MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA EN CONEJO. Lavara, R, Vicente, J. S., Marco-Jimenez, F., Baselga, M. 481

Genética: Selección Genómica

- ¿PUEDEN REALIZARSE EVALUACIONES GENÓMICAS EN PEQUEÑAS POBLACIONES DE SELECCIÓN? Ibáñez-Escriche, N., Sánchez, J.P. 484
- EFECTO DEL MODO DE DIVERGENCIA EVOLUTIVA EN LA PRECISIÓN DE LA SELECCIÓN GENÓMICA EN POBLACIONES MÚLTIPLES. Mouresan, E.F., González, A., Moreno, C., Altarriba, J., Varona, L. 487
- SELECCIÓN GENÓMICA EN EL GANADO VACUNO DE LECHE ESPAÑOL. Jiménez-Montero, J.A., González-Recio, O., Alenda, R. 490
- PREDICCIÓN GENÓMICA MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN SEMI-PARAMÉTRICA EN VACUNO LECHERO. Rodríguez-Ramilo, S.T., Jiménez-Montero, J.A., González-Recio, O. 493

Genética: Metodología y Poster

- EVALUACIÓN GENÉTICA (QUE NO GENÓMICA) MEDIANTE BOOSTING. Casellas, J. 496
- LA IMPRONTA GENÓMICA PATERNA Y LOS MODELOS CON EFECTOS MATER-NOS. González-Rodríguez, A., Mouresan, E.F., Altarriba, J., Díaz, C., Meneses, C., Moreno, C., Varona, L. 499
- CNV: CONSIDERANDO NUEVAS VARIANTES EN EL GENOMA. Ben Sassi, N., Fernández, A.I., González-Recio, O. 502
- INFLUENCIA DE LA LACTACIÓN SOBRE EL EMBRIÓN: ¿EPIGENÉTICA O EFECTO MATERNO?. González-Recio, O., Ugarte, E., Bach, A. 505
- VARIANZA Y COVARIANZA DEL PARENTESCO EN UN LOCUS. García-Cortés, L.A., Legarra, A., Chevalet, C., Toro, M. A. 508
- MEDIDAS DE CONSANGUINIDAD AL NUEVO Y VIEJO ESTILO. Rodríguez, M. C., Fernández, A. I., Barragán, C., Silió, L. 511
- ESTUDIO INICIAL DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DEL CONEJO IBICENCO A PARTIR DE INFORMACIÓN GENEALÓGICA. Martín de la Rosa, A., Cervantes, I., García-García, R.M., Rebollar, P.G., Arias-Álvarez, M., Lorenzo, P.L., Gutiérrez, J.P. 514
- DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD DESATURASA Y ELONGASA ENTRE TEJIDOS Y GENOTIPOS DE CERDOS DUROC. Henríquez, E., Ros-Freixedes, R., Pena, R.N., Tor, M., Estany, J. 517
- ASOCIACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN *PLIN2* CON CARACTERES DE CRECIMIENTO EN CERDOS DUROC. Gol, S., Ros-Freixedes, R., Bigi, M., Braglia, S., Tor, M., Pena, R.N., Estany, J., Davoli, R. 520
- ESTUDIO DE ASOCIACIÓN PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN GRASA DORSAL EN UN CRUCE IBÉRICO X LANDRACE CON UN *CHIP* DE 144 SNPs DEL SSC8. Revilla, M., Ramayo-Caldas, Y., Castelló, A., Corominas, J., Puig-Oliveras, A., Ibáñez-Escriche, N., Muñoz, M., Ballester, M., Folch, J.M. 523
- ANÁLISIS DE CANALIZACIÓN SOBRE EL PESO AL NACIMIENTO EN LA RAZA *BRUNA DELS PIRINEUS*. Fina, M., Ibáñez-Escriche, N., Piedrafita, J., Casellas, J. . 526

Genética: Estudios de Asociación

- MARCADORES SNP ASOCIADOS A TERNEZA EN DOS MÚSCULOS, *Flexor Digitorum* y *Psoas Major*, EN AVILEÑA NEGRA IBÉRICA. Quintero-Arboleda, X., Carabáño, M. J., Venturini, G., Meneses, C., Rueda, J., Díaz, C. 529

- BARRIDO GENÓMICO CON EL SNP-CHIP OVINO 50K PARA LA DETECCIÓN DE QTL CON INFLUENCIA SOBRE LA RESISTENCIA A NEMATODOS INTESTINALES EN EL GANADO OVINO DE RAZA CHURRA: ANÁLISIS DE LIGAMIENTO PARA EL RECUENTO DE HUEVOS EN HECES. Atlija, M., Gutierrez-Gil, B., Martínez Valladares, M., de la Fuente, L. F., Arranz, J. J. 532
- ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ARQUITECTURA GENÉTICA DEL CARÁCTER “ESTATURA” EN EL GANADO OVINO MEDIANTE UN ANÁLISIS DE LIGAMIENTO. Suarez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., García-Gámez, E., Arranz, J.J. 535
- BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES CAUSALES PARA ARTROGRIPOSIS Y MACROGLOSIA EN VACUNO DE RAZA PIEMONTESE: RESULTADOS PRELIMINARES. Biscarini, F., Del Corvo, M., Stella, A., Albera, A., Ferencaković, M., Pollott, G. 538
- ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÓMICO PARA EL CONTENIDO Y LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDOS DUROC. Manunza, A, González, R., Quintanilla, R., Mercadé, A., Castelló, A., Hernández, J., Pena, R.N., Casellas, J., Amills, M. 541
- IDENTIFICACIÓN DE UNA ASOCIACIÓN SIGNIFICATIVA ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA ADIPONECTINA (*ADIPOQ*) PORCINA Y LOS NIVELES SÉRICOS DE LDL. Quintanilla, R., Melo, C., Castelló, A., Zidi, A., Gallardo, D., Cánovas, A., Jordana, J., Díaz, I., Pena, R.N., Amills, M. 544
- NUEVO SNP DE LA *CALPASTATINA* (*CAST*) ASOCIADO CON LA TERNEZA DE LA CARNE DE BOVINO. Iguácel, L.P., Calvo, J.H., Kirinus, J.K., Serrano, M., Ripoll, G., Casasús, I., Joy, M., Pérez-Velasco, L., Sarto, P., Albertí, P., Blanco, M. 547
- ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN PRNP Y LOS CARACTERES LECHEROS EN LA RAZA LATXA. Vitezica, Z.G., Beltrán de Heredia, I., Ugarte, E. 550

Genética: Expresión Génica

- LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA A EN EL PIENSO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN METABÓLICA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN PORCINO. Ayuso, M., Fernández, A., Isabel, B., Rey, A.I., Benítez, R., Daza, A., López-Bote, C.J., Óvilo, C. 553
- EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA E EN LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS Y EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN *L. THORACIS* DE CORDEROS LIGEROS. González-Calvo, L., Ripoll, G., Molino, F., Pérez-Velasco, L., Sarto, P., Serrano, M., Joy, M., Calvo, J. H. 556
- EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LINO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS LIPOGÉNICAS EN EL TEJIDO GRASO SUBCUTANEO E INTRAMUSCULAR DE CORDEROS. Urrutia, O., Soret, B., Mendizabal, J.A, Insausti, K., Purroy, A., Arana, A. 559
- PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADOS A PH MUSCULAR 24H POST-MORTEM EN PORCINO. Pena, R.N., Ibáñez, N., Fernández, A.I., Folch, J.M., Casellas, J., Noguera, J.L. 562
- VARIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DEL MÚSCULO PORCINO EN ANIMALES CON FENOTIPOS EXTREMOS PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS. Puig-Oliveras, A., Ramayo-Caldas, Y., Corominas, J., Castelló, A., Pérez-Montarelo, D., Casellas, J., Folch, J.M., Ballester, M. 565
- ANÁLISIS COMPARATIVO DEL TRANSCRIPTOMA DEL TEJIDO ADIPOSO ENTRE CERDOS CON FENOTIPOS EXTREMOS PARA LA COMPOSICIÓN DE

ÁCIDOS GRASOS EN GRASA INTRAMUSCULAR. Corominas, J., Ramayo-Caldas, Y., Puig-Oliveras, A., Estellé, J., Castelló, A., Alves, E., Pena, R.N., Ballester, M., Folch, J.M.	568
- IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS EXPRESADAS MEDIANTE RNA-Seq EN CERDOS CON FENOTIPOS DIVERGENTES PARA CRECIMIENTO Y ENGRASAMIENTO. Martínez, A.M., Pérez-Montarelo, D., Rodríguez, C., Ibañez, N., Folch, J.M., Silió, L., Alves, E., Fernández, A.I.	571
- ESTUDIOS DE CO-ASOCIACIÓN GENÓMICA Y REDES GÉNICAS APLICADOS A LA DISECCIÓN GENÉTICA DEL CONTENIDO INTRAMUSCULAR DE ÁCIDOS GRASOS. Ramayo-Caldas, Y., Reverter, A., Ballester, M., Fortes, M.R.S., Esteve-Codina, A., Noguera, J.L., Fernández, A.I., Folch, J.M.	574
Genética: Mejora Genética de Porcino	
- INTERACCIÓN GENOTIPO X SISTEMA DE PRODUCCION PARA CALIDAD DE CANAL Y CARNE EN CERDOS IBERICOS DE MONTANERA Y CEBO DE CAMPO. García-Casco, J.M., Muñoz, M., Rodríguez, M.C., Silió, L.	577
- MEJORA DEL CONTENIDO DE ÁCIDO OLEICO EN CARNE DE CERDO MEDIANTE SELECCIÓN DIRECTA Y MARCADORES MOLECULARES. Ros-Freixedes, R., Pena, R.N., Tor, M., Estany, J.	580
- ASOCIACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA GENÉTICA AL VIRUS PRRS Y LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE LÍNEAS COMERCIALES. Pena, R.N., Estany, J., Fraile, L.	583
Genética: Diversidad Genética y Conservación	
- ELIMINACIÓN DE MUTACIONES DELETÉREAS EN PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN. de Cara, M.A.R., Villanueva, B., Toro, M.A., Fernández, J.	586
- MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIANTE EL PARENTESCO MOLECULAR: INFLUENCIA DEL CENSO EFECTIVO Y LA DENSIDAD DE SNPS. Gómez-Romano, F., Villanueva, B., de Cara, M.A.R., Fernández, J.	589
- RELACIONES GENOMICAS ENTRE LAS RAZAS OVINAS LECHERAS DEL PIRINEO OCCIDENTAL: LATXA Y MANECH. Legarra, A., Baloché, G., Barillet, F., Astruc, J.M., Soulas, C., Aguerre, X., Arrese, F., Mintegi, L., Lasarte, M., Beltrán de Heredia, I., Ugarte, E.	592
- INTROGRESION DE GENES DE CEBÚ DEL SAHEL EN LAS POBLACIONES BOVINAS TRIPANOTOLERANTES DE BURKINA FASO. Álvarez, I., Traoré, A., Fernández, I., Cuervo, M., Lecomte, T., Tamboura, H.H., Goyache, F.	595
- VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN LAS POBLACIONES FUNDADORAS DE PONI ASTURCÓN. Álvarez, I., Fernández, I., García, D., Cuervo, M., Lorenzo, L., Goyache, F.	598
- ESTIMAS GENÓMICAS DE PARENTESCO Y CONSANGUINIDAD EN UNA ANTIGUA PIARA CONSANGUÍNEA DE CERDO IBÉRICO. Saura, M., Fernández, A., Rodríguez, M.C., Toro, M.A., Barragán, C., Fernández, A.I., Villanueva, B.	601
- DETECCIÓN DE HUELLAS DE SELECCIÓN EN SEIS LOCI RELACIONADOS CON LA PIGMENTACIÓN EN CABRA. Badaoui, B., Manunza, A., D'Andrea, M., Pilla, F., Capote, J., Jordana, J., Ferrando, A., Martínez, A., Delgado, J.V., Landi, V., Gómez, M., Pons, A., El Ouni, M., Amills, M., Vidal, O.	604
- AVANCES EN LA INFERENCIA DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL EN PRESENCIA DE INDIVIDUOS EMPARENTADOS. Rodríguez-Ramilo, S.T., Toro, M.A., Fernández, J.	607

CALIDAD DE LOS PRODUCTOS

Calidad de los productos: Vacuno. Efecto de la dieta.

- EFECTO DE DIETAS ENRIQUECIDAS CON SEMILLA DE LINO Y CLA EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL DEPÓSITO SUBCUTÁNEO DE TERNEROS FRISONES. Gómez, I., Beriain, M.J., Mendizábal, J.A., Sarriés, M.V., Pau, V. Insausti, K., Albertí, P., Realini, C.E., Purroy, A. 613
- EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE SEMILLA DE LINO Y CLA EN LA DIETA SOBRE LA ACEPTABILIDAD DE LA CARNE DE VACUNO. Barahona, M., Campo, M.M., Olleta, J.L., Sañudo, C., Albertí, P., Realini, C.E. 616
- INFLUENCIA DE LA EDAD DE CASTRACIÓN Y DEL NIVEL Y CALIDAD DE LA PROTEÍNA DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE DE TERNEROS FRISONES. Sañudo, C., Muela, E., Campo, M.M., Valero, M.V., Resconi, V., Monge, P., Fugita, C.A., Catalán, O., Prado, I.N. 619
- EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ADITIVOS EN LA DIETA SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE TERNEROS MESTIZOS. Fugita, C.A., Prado, I.N., Torrecilhas, J.A., Sato, V.A., Valero, M.V., Ornaghi, M.G., Cortez, R.A., Guerrero, A., Sañudo, C. 622
- PROPOLEO Y ACEITES FUNCIONALES EN LA DIETA DE TERNEROS MESTIZOS (½ ANGUS VS. ½ ZEBU). Valero, M.V., Sañudo, C., Zawadzki, F., Campo, M.M., Fugita, C.A., Olleta, J.L., Prado, I. N. 625

Calidad de los productos: Técnicas analíticas

- PREVALENCIA DE OLOR SEXUAL EN CERDOS MACHOS ENTEROS ESPAÑOLES. RESULTADOS PRELIMINARES CON LA TÉCNICA “HUMAN NOSE”. Zammerini, D., Panella-Riera, N., Tarsitano, M.A., Borrissier, F., Olivares, A., Garrido, M.D., Martínez, B., Oliver, M.A. 628
- INTEGRACIÓN DE SENSORES NIRS Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN Y DE LA COMUNICACIÓN COMO MOTOR DE INNOVACIÓN EN LA INDUSTRIA DEL CERDO IBÉRICO. Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J.E. 631
- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL EN CARNE DE CORDERO A PARTIR DE LA CONCENTRACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL EN PLASMA. Molino, F., Blanco, M., Ripoll, G., González-Calvo, L., Calvo, J. H., Joy, M. 634
- SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE SALADO EN JAMÓN IBÉRICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO. Fernández Novales, J., Garrido Novell, C., de Pedro Sanz, E., Guerrero, J. E., Garrido Varo, A., Pérez Marín, D. 637
- PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGIA PARA LA EVALUACIÓN DEL VETEA-DO EN CAÑA DE LOMO IBÉRICA USANDO CÁMARAS HIPERESPECTRALES. Garrido-Novell, C., Pérez-Marín, D. C., Garrido-Varo, A., Fernández-Novales, J., Kim, M., Guerrero-Ginel, J. E. 640
- DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ENGRASAMIENTO DE CANALES BOVINAS MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN. González, L., Mendizábal, J.A., Albertí, P., Ripoll, G., Purroy, A. 643
- ESTIMACIÓN META-ANALÍTICA DE LA REDUCCIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN CANALES DE BOVINO DEBIDO AL ENFRIAMIENTO. Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., Butler, F. 646

- ESTUDIO DE META-ANÁLISIS DE LAS CORRELACIONES ENTRE LAS MEDIDAS DE LOS TEJIDOS OBTENIDAS POR ULTRASONIDOS Y SUS HOMÓLOGAS DE LA CANAL DE BOVINOS. Xavier, C., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V.A.P. 649

Calidad de los productos: Miscelánea

- CAMBIOS EN LA COMPOSICION EN ÁCIDOS GRASOS DEL LECHÓN IBÉRICO LACTANTE. Badillo, I., Haro, A., Fernández-Carballar, F., Aguinaga, M.A., Nieto, R., Aguilera, J. F. 652
- EFECTO DEL AYUNO HASTA 34°C DÍA EN LA CALIDAD INSTRUMENTAL DE LA CARNE DE TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS). López-Luna, J., Villarroel, M. 655
- ACTITUDES DE LOS CONSUMIDORES Y PRODUCTORES HACIA LA CARNE DE CORDERO DE RAZA OJINEGRA DE TERUEL. Fortea, C., Maza, M.T., Gracia, A. 658
- ESTUDIO DE CONSUMIDORES EN LABORATORIO Y HOGAR: DOS ESTRATEGIAS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE CARNE EN PEQUEÑOS RUMIANTES. Guerrero, A., Campo, M.M., Cilla, I., Olleta, J.L., Alcalde, M.J., Horcada, A., Sañudo C. 661

Calidad de los productos: Ovino. Efecto de la dieta

- CONSERVACIÓN DE CARNE DE CORDERO ENRIQUECIDA EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y DIFERENTES ANTIOXIDANTES: EXTRACTO DE ACEITUNA RICO EN POLIFENOLES Y VITAMINA E. Apeleo, E., Muíño, I., Pérez-Santaescolástica, C., Bermejo, R., De la Fuente, J., Lauzurica, S., Díaz, M.T., López, O., Cañeque, V., Pérez, C. 664
- EMPLEO DE SEMILLA EXTRUSIONADA DE LINO EN LA RACIÓN DE OVEJAS CHURRAS: EFECTO SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA Y EL COLOR DE LA CARNE DE LECHAZO. Gallardo, B., Vieira, C., Rubio, B., Manso, T. 667
- EMPLEO DE ORUJO DE UVA EN LA RACIÓN DE CORDEROS DURANTE EL PERIODO DE CRECIMIENTO-CEBO: INGESTIÓN, RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS Y CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL. Guerra-Rivas, C., Gallardo, B, Lavín, M.P., Mantecón A.R., Vieira, C., Manso, T. 670
- EFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE VINO TINTO EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE HAMBURGUESAS DE CORDERO. Muíño, I., Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., Díaz, M.T., Pérez, C., Rivas-Cañedo, A., Bermejo, R., López, O., Lauzurica, S., De la Fuente, J., Cañeque, V. 673
- EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN EN LA DIETA CON EXTRACTO DE VINO TINTO O CON VITAMINA E EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SENSORIAL DE CARNE DE CORDERO ENRIQUECIDA EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3. Muíño, I., Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., López, O., Rivas-Cañedo, A. Lauzurica, S., De la Fuente, J., Pérez, C., Cañeque, V., Díaz, M.T. 676
- LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE SOJA AUMENTA LA GRASA EN LECHE Y MEJORA EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN CABRAS ESTRESADAS TÉMICAMENTE. Hamzaoui, S., Salama, A.A.K., Caja, G., Albanell, E., Such, X. 679
- EFECTO DE LA ADICIÓN DE ÁCIDO CARNÓICO A LA DIETA DE CORDEROS LECHALES SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA CARNE. Morán, L., Giráldez, F.J., Mateo, J., Blanco, C., Soto, S., Andrés, S. 682
- EFECTO DE LA ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA DE CORDEROS LECHALES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CARNE ALMACENADA CRUDA Y COCINADA. Morán, L., Giráldez, F.J., Mateo, J., Blanco, C., Soto, S., Andrés, S. 685

Calidad de los productos: Tecnología

- COLOR INSTRUMENTAL, APRECIACIÓN VISUAL Y OXIDACIÓN LIPÍDICA DE PECHUGA DE POLLO CONSERVADA EN ENVASES CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y PLATA. Ripoll, G., Albertí, P., Panea, B. 688
- VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA COMBINACIÓN DE ZN Y AG USADOS EN DIFERENTE PROPORCIÓN EN LA FORMULACIÓN DE UN ENVASE PARA PECHUGAS DE POLLO. Panea, B., Albertí, P., Ripoll, G. 691
- CALIDAD Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL LOMO DE CERDO CONGELADO. Alonso, V., Tenas, J., Muela, E., Roncalés, P., Beltrán, J.A. 694
- EVOLUCIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO DEL LOMO (m. LONGISSIMUS DORSI) DE CERDOS IBÉRICOS DE MONTANERA ENVASADO EN ATMOSFERA MODIFICADA. Prior, E., García-Torres, S., López, A., Cabeza de Vaca, M., Tejerina, D. 697
- OXIDACIÓN LIPÍDICA EN CARNE DE CORDERO LIGERO: RELACIÓN ENTRE LAS DETERMINACIONES INSTRUMENTAL Y SENSORIAL. Muela, E., Sañudo, C., Alonso, V., Medel, I., Beltrán, J.A. 700
- EFECTO DEL TIEMPO DE CONGELACIÓN SOBRE LA TEXTURA DE LA CARNE EN CORDEROS TIPO TERNASCO. Monge P., Muela, E., Olleta, J.L., Campo, M.M., Medel, I., Sañudo, C., Beltrán, J.A. 703

Calidad de los productos: Productos

- EFECTO DEL HIDROXITIROSOLO EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE HAMBURGUESAS DE CORDERO ENRIQUECIDAS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3. Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., Muíño, I., Lauzurica, S., Rivas-Cañedo, A. López, O., Cañeque, V., Pérez, C., Bermejo, R., Díaz, M.T., De la Fuente, J. 706
- CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MANTAS DE CARNE SALADA Y SECA DE OVINOS Y CAPRINOS EN AMBIENTE PREINDUSTRIAL. Oliveira, A. F., Paulos, K., Rodrigues, S., Leite, A., Pereira, E., Teixeira, A. 709
- DESARROLLO DE UNA BOLOGÑA UTILIZANDO CARAOTA EXTRUDIDA (*Phaseolus vulgaris*) COMO AGENTE EXTENSOR. García, O., Acevedo, I., Ruiz-Ramírez, J., Godoy, M. 712
- COMPARACION DE LA REPERCUSION DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON ACEITE ESENCIAL DE CLAVO O TOMILLO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE DE OVEJA . Revilla, I., Sanjuán, D., Vivar-Quintana, A.M., M.A., Palacios . . 715
- PRIMEROS RESULTADOS SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA MICROFLORA DEL QUESO MANCHEGO A LO LARGO DE LA MADURACIÓN EN RELACIÓN CON EL TIPO DE MOLDE UTILIZADO EN SU ELABORACIÓN. Oliete, B., Jiménez, L., Pérez-Guzmán, M.D., Arias, R. 718
- COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE OVEJA ASSAF Y MODIFICACIÓN EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DEL QUESO DE TERUEL DURANTE LA MADURACIÓN. Estrada, O., Molino, F., Joy, M., Ariño, A., Juan, T. 721
- AUTENTICIDAD DE SALCHICHAS DE CARNE DE OVINO Y CAPRINO. Leite, A., Rodrigues, S., Paulos, K., Oliveira, A. F., Pereira, E., Teixeira, A. 724
- CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE SALCHICHAS FRESCAS DE OVINO Y CAPRINO. Paulos, K., Rodrigues, S., Leite, A., Oliveira, A. F., Pereira, E., Teixeira, A. 727
- CHISTORRA DE NAVARRA: PERFIL SENSORIAL Y COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA. Beriain, M.J., Indurain, G., Amatria, L., Gómez, I., Sarriés, V., Insausti, K. . . . 730

- EVALUACION DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS CARNE PARA HAMBURGUESA CON HARINA DA DE QUINCHONCHO (CAJANUS CAJAN) CRUDA Y COCIDA. Ruiz-Ramírez, J., García, O., Acevedo, I. 733

Calidad de los productos: Vacuno. Efecto del manejo/raza

- SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE TERNEROS JÓVENES DE RAZA TUDANCA. Serrano, E., Humada, M.J., Cimadevilla, C. 736
- EVOLUCIÓN POST-MORTEN DE LA TERNEZA DE CARNE DE TERNERA ECOLÓGICA FRENTE A CONVENCIONAL Y ESTUDIO PRELIMINAR DEL PERFIL PROTEOLÍTICO DURANTE LA MADURACIÓN. López, A., García-Torres, S., Tejerina, D., Prior, E., Cabeza de Vaca, M., Fernández-Suárez, V., Oliván, M. 739
- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA SUBCUTÁNEA EN TERNEROS LIMUSÍN Y TUDANCA x CHAROLÉS PRODUCIDOS EN EL VALLE DEL NANSÁ (CANTABRIA). Aldai, N., Lavín, P., Jaroso, R., Sánchez-Briñas, B., Mantecón, A.R. 742
- RENDIMIENTO COMERCIAL DE TERNEROS PRODUCIDOS DE RAZAS TUDANCA, LIMUSÍN, ASTURIANA DE LA MONTAÑA Y CRUCE DE TUDANCA POR CHAROLES. Lavín, P., Jaroso, R., Aldai, N., Sanchez-Briñas, B., Mantecón, A.R. 745

Calidad de los productos: Ovino-caprino. Efecto del manejo/raza

- EFECTO DEL TIEMPO DE ESTANCIA EN CEBADERO Y DE LA EDAD DE SACRIFICIO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA DE CORDEROS DE RAZA RASA ARAGONESA. Campo, M.M., Resconi, V.C., Conesa, A., Horcas, E., Sañudo, C. 748
- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CABRITOS CASTRADOS Y SACRIFICADOS A LOS 7-8 MESES DE EDAD PRODUCIDOS EN PASTOS DE MONTAÑA DE LOS PICOS DE EUROPA. Humada, M.J., Mateo, J., García F.J., Serrano, E. 751
- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CORDEROS LECHALES DE LA MARCA DE CALIDAD “LECHAZOS MONTAÑAS DE LIÉBANA”. Humada, M.J., Mateo, J., García F.J., Serrano E. 754
- CONTENIDO EN MINERALES Y RELACION Fe/Zn EN CARNE DE CABRITO DE RAZA BRAVIA EM MODO DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICO Y EFECTOS NUTRICIONALES. Pires, P., Vilarinho, M., Barros, M., Fernandes, E., Araújo, J.P. 757
- CARACTERES MORFOLÓGICOS, PRODUCTIVOS Y DE BIENESTAR EN OVEJAS DE RAZA CHAMARITA. Pascual-Alonso, M., Miranda-de la Lama, G.C., Aguayo-Ulloa, A., Olleta, J.L., Sañudo, C., María, G.A. 760

PATOLOGIA ANIMAL

Patología animal: Enfermedades víricas y priónicas

- INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL CODON 222 DEL GEN PRNP EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA EN CABRAS. Pitarch, J.L., Langeveld, J., Bossers, A., Marín, B., Barillet, F., Bouvier, F., Monleón, E., Bolea, R., Monzón, M., Hedman, C., Hernández, R., Garza, M.C., Andreoletti, O., Badiola, J.J., Acín, C. 765
- ESTUDIO DE TRANSMISIBILIDAD DEL SCRAPIE ATÍPICO Y LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA OVINA EN LA ESPECIE PORCINA. Hedman, C., Marín, B., Corbière, F., Filali, H., Vázquez, F., Romero, A., Hernandez, R., Pitarch, J.L., Girón, W., Sarasa, R., Garza, MC., Vidal, E., Pumarola, M., Bolea, R., Andreoletti, O., Badiola, J.J. 768

- DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR-DUPLEX DE LA NUEVA VARIANTE RHDVb DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA EN CONEJOS. Sarto, P., Calvo, J.H., Calvo, A.J., Monroy, F., Calvete, C. 771
- ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA EN VENEZUELA. Virla, J., Aranguren, J.A., Portillo, M.G., Quintero-Moreno, A., Zapata, D., Fernández J., Trujillo, M., Mejía-Silva, W. . . 774

Patología animal: Enfermedades parasitarias

- PRECISIÓN DEL TEST DE ECLOSIÓN DE HUEVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA ANTIHELMINTICA EN CONDICIONES DE CAMPO. Calvete, C., Calavia, R., Uriarte, J. 777
- DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN OVINA POR F. hepatica MEDIANTE PCR Y DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN REBAÑOS INFECTADOS DE FORMA NATURAL. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M. 780
- EFECTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON ANTIOXIDANTES (ACEITE DE LINO Y α -TOCOPHEROL) SOBRE LA FASCIOSIS EXPERIMENTAL OVINA. Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Benavides-Silván, J., Morán-Lobato, L., Rojo-Vázquez, F.A., Andrés-Llorente, S., Martínez-Valladares, M. 783
- TRATAMIENTO DE LA PARANFISTOMOSIS BOVINA. Suárez, J.L., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Romasanta, A., Miguélez, S., Sanchís, J., Francisco, R., Bonilla, R., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S. 786
- UTILIZACION DE HONGOS PARASITICIDAS PARA EL CONTROL DE TREMATODOSIS EN GANADO BOVINO. Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Rodríguez, M.I., Oliver, A., Hernández, J.A., Fernández, M., Gómez, D., Arroyo, F., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S. 789
- EVALUACION DE UN MÉTODO COMBINADO DE CONTROL DE LA HEMONCOSIS OVINA BAJO CONDICIONES CONTROLADAS. Arroyo Balán, F., López Arellano, M., Liébano Hernández, E., Vázquez Prats, V., Ortiz de Montellano, A, Arias Vázquez, M.A., Cazapal-Monteiro, C., Mendoza de Gives, P. 792
- SOLUCIONES SOSTENIBLES PARA LA PREVENCIÓN DE PARASITOSIS EN GANADO VACUNO EN REGIMEN ECOLÓGICO. Arias, M.S., Francisco, I., Cazapal-Monteiro, C., Hernández, J.A., Gómez, D., Fernández, M., Cortiñas, F.J., Suárez, J.L., Paz-Silva, A. 795
- MONITOREO NACIONAL DE LA NOSEMOSIS - RESULTADOS PREVIOS DEL PROYECTO PORTUGAL, APICULTURA Y NOSEMA. Pires-Sância M.A., Murilhas, A.M., Almeida, P.R., Valério M.J. 798
- LOS FLEBOTOMOS (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) ASOCIADOS A LAS EXPLOTACIONES DE RUMIANTES EN ESPAÑA Y SU INTERÉS SANITARIO. Lucientes, J., Estrada, R., Salido, V., Oropeza, V., Miranda, M.A., Pagés, N., Molina, R., Sánchez-Murillo, J.M., Delacour, S., Ruiz-Arrondo, I., Pinal-Prieto, R., Alarcón-Elbal, P.M., Castillo-Hernández, J.A. 801
- ETIOLOGÍA DE LOS DECOMISOS EN UN MATADERO DE OVINO. Valcárcel, F., Vilallonga, D., Aguilar, A., Sánchez, M. 804
- PÉRDIDAS ECONÓMICAS DEBIDAS A LOS DECOMISOS EN UN MATADERO DE OVINO. Valcárcel, F., Vilallonga, D., Sánchez, M., Aguilar, A. 807

Patología animal: Enfermedades bacterianas y otras patologías

- ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LESIONES MANDIBULARES OVINAS EN CAMPO Y MATADERO. Ruiz de Arcaute, M., Ferrer, L.M., Lacasta, D., Bueso, J.P., Borobia, M., De las Heras, M., Ortega, M., González, J.M., Gartzandia, A., Ortín, A., Marca, C., Loste, A., Ramos, J.J. 810
- USO DE LOS RAYOS X EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS PATOLOGÍAS DE VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS EN EL GANADO OVINO. Ruiz de Arcaute, M., Ferrer, L.M., Lacasta, D., Conde, T., Fondevila, J., Gartzandia, A., González, J.M., Ortega, M., Ortín, A., Marca, C., Espada, M., Figueras, L. 813
- UTILIZACIÓN DE LA TERMOGRAFÍA DE INFRARROJOS DURANTE EL ORDEÑO PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIONES INTRAMAMARIAS EN OVEJAS. Castro-Costa, A., Caja, G., Salama, A.A.K., Rovai, M., Flores, C., Aguiló, J. 816
- RELACIÓN ENTRE LA EXCRECIÓN DE COXIELLA BURNETII EN HECES, LECHE Y FLUIDO VAGINAL AL PARTO y LA PRESENCIA DE LA BACTERIA EN LOS COTILEDONES PLACENTARIOS. Tutusaus -Batlle, J., López-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I. 819
- INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON SALMONELLA ENTERICA SUBSP. DIARIZONAE SEROTIPO 61:K:1:5:(7) EN CORDERAS. Figueras, L., Lacasta, D., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Bueso, J.P., De las Heras, M., Ortega, M., González, J.M., Espada, M., Ruiz de Arcaute, M. 822
- PAPEL DE LA FAUNA SILVESTRE EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELLOSIS PORCINA EN CEBADEROS. Andrés, S., Vico, J.P., Samper, S., Garrido, V., Mainar-Jaime, R.C. 825
- SALMONELLOSIS EN PORCINO REPRODUCTOR DE NAVARRA. Garrido, V., Sánchez, S., San Román, B., Zabalza-Baranguá, A., Grilló, M.J. 828
- DESARROLLO DE PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OVINOS INMUNIZADOS CON VACUNAS-GFP. Zabalza, A., San Román, B., Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Grilló, M.J. 831
- EFICACIA DE DIVERSAS PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS PORCINA. Dieste-Pérez, L., De Miguel, M.J., Marín, C.M., Barberán, M., Blasco, J.M., Muñoz, P.M. 834

MICROBIOLOGÍA DIGESTIVA

Microbiología Digestiva: Microbiología Digestiva I

- ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA PRODUCCIÓN DE METANO EN RUMIANTES. Yáñez-Ruiz, D.R., Abecia, L. 839
- EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS EN LA DIETA SOBRE BACTERIAS DEL GRUPO BUTYRIVIBRIO EN FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO. Ramos-Morales, E., Martínez, G., Abecia, L., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E., Yáñez-Ruiz, D.R. 842
- COMPARACIÓN DEL MUESTREO A TRAVÉS DE CÁNULA RUMINAL O Sonda ESOFÁGICA EN OVEJAS Y CABRAS: PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN Y MICROORGANISMOS DEL RUMEN. Ramos-Morales, E., Martín-García, A.I., Jiménez, E., Arco-Pérez, A., Yáñez-Ruiz, D.R., Frutos, P., Hervás, G. 845

- MODIFICACIONES TÉCNICAS EN FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO: EFECTOS SOBRE LA POBLACIÓN DE PROTOZOOS Y LA FERMENTACIÓN. Cabeza-Luna, I., Carro, M.D., Muñoz-Martínez, A., Molina-Alcaide, E. 848

Microbiología Digestiva: Microbiología Digestiva II

- EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS RUMINALES Y LOS PARÁMETROS FERMENTATIVOS EN FERMENTADORES RUSITEC. Mateos, I., Ranilla, M.J., Saro, C., Díaz, A., Carro, M.D. 851
- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD EFECTO DEL TIPO Y FORMA DE PRESENTACIÓN DEL CEREAL DEL CONCENTRADO SOBRE LA MICROBIOTA RUMINAL EN TERNEROS EN CEBO INTENSIVO. Gimeno, A., Al-Alami, A., Abecia, L., Yáñez-Ruiz, D.R., Castrillo, C., Fondevila, M. 854
- UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PIROSECUENCIACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RUMEN EN OVEJAS ALIMENTADAS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON MICROALGAS MARINAS. Castro-Carrera, T., Toral, P.G., Hervás, G., McEwan, N.R., Abecia, L., Frutos, P., Girdwood, S.E., Worrgan, H.J., Belenguer, A. 857
- COMPARACIÓN DE LA FERMENTACIÓN Y LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RUMEN EN VACAS Y CABRAS ALIMENTADAS CON LA MISMA DIETA. Belenguer, A., Frutos, P., Bernard, L., Hervás, G., Chilliard, Y., Toral, P.G. 860
- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TIOSULFINATO SOBRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS Y EL PERFIL DE ARQUEAS METANOGÉNICAS EN EL RUMEN DE CAPRINO. Martínez-Fernández, G., Abecia, L., Ramos-Morales, E., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E., Yáñez-Ruiz, D. R. 863
- ESTUDIO MEDIANTE PIRO-SECUENCIACIÓN DE LA COMUNIDAD DE ARQUEAS EN EL RUMEN DE CABRAS TRAS LA INTERVENCIÓN CON UN COMPUESTO ANTIMETANOGENICODURANTE EL PERIODO DE LACTACION. Abecia, L., Lewis, K., Martínez, G., Martín-García, A.I., Newbold, C.J., Yáñez-Ruiz, D. 866

Microbiología Digestiva: Microbiología Digestiva III

- ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES METANÓGENAS EN LA DIGESTION ANAEROBIA DEL PURIN Y SU RELACIÓN CON EL APORTE EXOGENO DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES O ARQUEAS EXÓGENAS. Seradj, A.R., Morazán, H., Alvarez, J., Abecia, L., Babot, D., Yáñez-Ruiz, D.R., Balcells, J. 869
- EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE *BACILLUS CEREUS* VAR. TOYOI PARA MODIFICAR LA INVASIVIDAD DE *ESCHERICHIA COLI* K88 Y *SALMONELLA TYPHIMURIUM* EN CELULAS IPEC-J2. González-Ortiz, G., Cerdà-Cuéllar, M., Castillo, M., Solà-Oriol, D., Martín-Orúe, S.M. 872
- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN JABALÍES. Barrios, V., Carvajal, A., Miranda, R., Estrada, O., Argüello, H., García, M., Naharro, G., Rubio, P. 875
- DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN LACTOBACILOS AISLADOS DE JABALÍES. Barrios, V., Carvajal, A., Miranda, R., Estrada, O., Argüello H., García, M., Naharro, G. Rubio, P. 877

Microbiología Digestiva: Microbiología Digestiva IV

- RECUENTO MICROBIANO EN HECES DE LECHONES A DÍA 5 Y 19 TRAS EL DESTETE EN CONDICIONES DE PRODUCCIÓN INDUSTRIAL. Diago, S., Letosa, J., Fernández, C., Letosa, A., Benito, A., Bríngola, B. 879

- EFECTO DE LA ADICIÓN EN EL PIENSO DE MANANOLIGOSACÁRIDOS Y B-GLUCANOS DE LEVADURAS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE GAZAPOS. El Abed, N., Badiola, I., Trocino, A., Tazzoli, M., Majolini, D., Pérez de Rozas, A., Combes, S., Cauquil, L., Acosta, N., Heras, A., Menoyo, D., García, J., Xiccato, G., Carabaño, R. 882
- EFECTO DEL TIPO DE DESTETE EN CONEJAS MULTÍPARAS SOBRE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA EN EL CIEGO DE SUS GAZAPOS. Rodríguez-Romero, N., Abecia, L., Martínez-Vallespín, B., Fondevila, M. 885

Microbiología Digestiva: Póster

- DETERMINACIÓN DE ARQUEAS Y BACTERIAS TOTALES CON MÉTODOS DE PCR DIRECTA PARA MONITORIZAR DIGESTORES ANAEROBIOS ALIMENTADOS CON PURINES DE CERDO. Moset, V., Bertolini, E., Cerisuelo, A., Olmos, A., Cambra, M., Cambra-López, M. 888

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Abad-Guamán, R.	198, 201	Alvarez, J.	869
Abecia, J.A.	76, 246, 255, 285, 341, 344, 368, 839, 842, 854, 857, 863, 866, 869, 885	Álvarez, S.	76, 326
Abo-Shady, H.M.	451	Alvarez-Rodríguez, J. ..	100, 103, 106, 109
Acevedo, I.	712, 733	Álvarez-Rodríguez, M.	398
Acín, C.	765	Alves, E.	568, 571
Acosta, N.	882	Amann, O.	82
Adell, E.	189	Amatria, L.	730
Aguado, E.	195	Amills, M.	541, 544, 604
Aguayo-Ulloa, A.	760	Andreoletti, O.	765, 768
Aguayo-Ulloa, L.A.	46, 49, 52	Andrés, S.	216, 682, 685, 825
Aguerre, X.	592	Andrés-Llorente, S.	783
Aguilar, A.	804, 807	Apeleo, E.	664, 673, 676, 706
Aguilera, J. F.	652	Arana, A.	559
Aguiló, J.	816	Aranguren, J.A.	774
Aguinaga, M.A.	652	Araújo, G.	300
Ait-Saidi, A.	91, 94	Araújo, J.P.	19, 22, 25, 40, 43, 67, 757
Al Alami, A.	306, 309	Arco-Pérez, A.	246, 845
Alabart, J.L.	338, 371, 374, 392	Argente, M.J.	317, 460, 463
Al-Alami, A.	258, 854	Argüello H.	875, 877
Alarcón-Elbal, P.M.	801	Arias Vázquez, M.A. ...	792
Albanell, E.	207, 679	Arias, M.S.	786, 789, 795
Albera, A.	538	Arias, R.	718
Albertí, P.	547, 613, 616, 643, 688, 691	Arias-Álvarez, M.	195, 514
Alcalde, M.J.	661	Ariño, A.	721
Aldai, N.	742, 745	Arranz, J. J.	532, 535
Alenda, R.	445, 448, 490	Arrese, F.	592
Alfonso, C.	204	Arriaga Jordán, C. M. ..	28, 297
Aljumaah, R.S.	82	Arroyo Balán, F.	792
Almeida, J.C.	19, 25	Arroyo, F.	789
Almeida, P.R.	798	Arruga, D.	410
Almería, S.	323	Asiain, J.	70
Alonso, V.	694, 700	Astruc, J.M.	592
Alonso-Molero, J.	398	Atlija, M.	532
Alshaikh, M.A.	82	Atti, N.	183
Altarriba, J.	487, 499	Ausín, L.	195
Álvarez, I.	595, 598	Avilés, M.	377
		Ayadi, M.	82
		Ayuso, M.	132, 553

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Azevedo, J.	347, 350, 353, 356	Berrocoso, J. D.	159, 243
Babot, D.	100, 103, 106, 109, 869	Bertolini, E.	888
Bach, A.	300, 312, 505	Besa, A.	434
Badaoui, B.	604	Bigi, M.	520
Badawy, A.Y.	320, 457	Biscarini, F.	538
Badillo, I.	652	Blanch, E.	425
Badiola, I.	882	Blanco, C.	216, 282, 682, 685
Badiola, J.J.	765, 768	Blanco, M.	219, 547, 634
Bahchaga, K.	451	Blanco-Penedo, I.	40, 43, 67
Balcells J.	61, 106, 103, 109, 240, 264, 869	Blasco, A.	64, 457, 460, 463, 466
Ballester, L.	380	Blasco, I.	37
Ballester, M.	523, 565, 568, 574	Blasco, J.M.	831, 834
Baloche, G.	592	Blavi, L.	150
Banzo, P.	392	Bodas, R.	216, 261, 273, 282
Barahona, M.	616	Bolea, R.	765, 768
Barberán, M.	834	Bonet, J.	141
Barbosa, S.F.	67	Bonilla, R.	786
Barillet, F.	592, 765	Borobia, M.	810
Barragán, C.	511, 601	Borrás, M.	189
Barrios, V.	875, 877	Borrisser, F.	628
Barros, M.	757	Bossers, A.	765
Bartolomé, D.J.	261, 273	Bouali, O.	222
Baselga, M.	469, 475, 478, 481	Bouvier, F.	765
Belenguer, A.	210, 213, 857, 860	Braglia, S.	520
Beltrán de Heredia, I. ...	279, 550, 592	Bravo, D.	252
Beltrán, J.A.	694, 700, 703	Bríngola, B.	879
Ben Sassi, N.	502	Bueso, J.P.	810, 822
Benaouda, M.	291	Burón, T.	192
Benavides-Silván, J. ...	783	Busqué, J.	55, 58
Benhissi, H.	279	Bustinza, R.H.	73
Benítez, R.	553	Butler, F.	646
Benito, A.	879	Cabeza de Vaca, M.	697, 739
Beriain, M.J.	613, 730	Cabeza-Luna, I.	848
Bermejo, R.	664, 673, 706	Cabrera, S.	82
Bernard, L.	210, 213, 960	Cadavez, V.	22, 43, 646
Bernués, A.	121	Cadavez, V.A.P.	649
		Caja, G.	82, 85, 88, 91, 94, 207, 679, 816
		Calavia, R.	777

AUTORES	Páginas
Calsamiglia, S.	31, 252
Calvete, C.	771, 777
Calvo, A.J.	771
Calvo, J. H.	219, 371, 547, 556, 634, 771
Cámara, L.	159, 243
Cambra, M.	888
Cambra-López, M.	189, 888
Campillo, I.	398
Campo, M.M.	616, 619, 625, 661, 703, 748
Cánovas, A.	544
Cantalapiedra, J.	40, 43, 67
Cañeque, V.	664, 673, 676, 706
Capote, J.	604
Carabaño, M. J.	451, 529
Carabaño, R.	198, 201, 882
Cardozo-Cerquera, J.A.	422
Carrasco, J.A.	440
Carro, M.D.	186, 270, 848, 851
Cartuche, L.	64
Carvajal, A.	875, 877
Casao, A.	344, 368, 410, 413
Casares, L.	425
Casasús, I.	112, 115, 118, 121, 329, 332, 335, 547
Casellas, J.	496, 526, 541, 562, 565
Castelló, A.	523, 541, 544, 565, 568
Castillejos, L.	31, 138
Castillo, M.	872
Castillo-Hernández, J.A.	801
Castrillo, C.	258, 306, 309, 854
Castro-Carrera, T.	210, 213, 857
Castro-Costa, A.	816
Catalá, M.G.	359, 362

AUTORES	Páginas
Catalán, O.	619
Cauquil, L.	882
Cazapal-Monteiro, C.	786, 789, 792, 795
Cebrián-Pérez, J.A.	368, 410, 413, 422
Cerdà-Cuéllar, M.	872
Cerisuelo, A.	141, 189, 888
Cerqueira, J.O.L.	40, 19, 22, 25, 43, 67
Cervantes, I.	514
Chevalet, C.	508
Chilliard, Y.	210, 213, 860
Cilla, I.	661
Cimadevilla, C.	736
Cocero, M.J.	371
Colmenar, L.	76
Coma, J.	103, 141
Combes, S.	882
Conde, T.	813
Conesa, A.	748
Contreras, D.	109
Contreras, I.	344
Corbière, F.	768
Corominas, J.	523, 565, 568
Correia, T.	347, 350, 353, 356
Cortés, X.	61, 264
Cortez, F.	347, 353
Cortez, R.A.	622
Cortiñas, F.J.	795
Costa, A.	85
Coy, P.	377, 380
Crecente, S.	180
Crespo, R.	204
Cuervo, M.	595, 598
D'Andrea, M.	604
Davin, R.	147
Davoli, R.	520
Daza, A.	132, 448, 553
de Campanere, S.	288
de Cara, M.A.R.	586, 589

AUTORES**Páginas**

de Diego, N.	162
de la Fuente, J.	664, 673, 676, 706
de la Fuente, L. F.	532
de la Riba, S.	195
de las Heras, M.	810, 822
de Mercado, E.	135, 168, 171, 437, 440
de Miguel, M.J.	834
de Paz-del Río, R.	448
de Pedro Sanz, E.	631, 637
de Vega, A.	258, 303, 306, 309
del Corvo, M.	538
Delacour, S.	801
Delgado, J.V.	604
Descals, P.	240
Devant, M.	312
Diago, S.	879
Díaz, A.	186, 270, 851
Díaz, C.	451, 499, 529
Díaz, I.	544
Díaz, M.T.	664, 673, 676, 706
Díaz-Medina, E.	82
Dieste-Pérez, L.	834
Domingo-Sanz, J.	410
Domínguez, J. C.	434
Dorantes, J.A.	79
Dosil, J.	303
El Abed, N.	882
El Nagar, A. G.	469, 475, 478
El Ouni, M.	604
El-Sayed, H.	82
El-Shafei, M.H.	82
Esclapez, A.	463
Espada, M.	813, 822
Espinosa, G.	31
Estany, J.	517, 520, 580, 583
Estaún, J.	303, 306
Estellé, J.	568

AUTORES**Páginas**

Esteve-Codina, A.	574
Estrada, O.	721, 875, 877
Estrada, R.	801
Ferenčaković, M.	538
Fernandes, E.	757
Fernández, J.	774
Fernández Novales, J.	637
Fernández, A.	132, 553, 601
Fernández, A. I.	511, 502, 562, 571, 574, 601
Fernández, C.	879
Fernández, I.	595, 598
Fernández, J.	586, 589, 607
Fernández, M.	210, 213, 789, 795
Fernández, N.	79
Fernández-Carballar, F.	652
Fernández-Díez, C.	431
Fernández-Figares, I.	144, 174
Fernández-Gago, R.	434
Fernández-Novales, J.	640
Fernández-Suárez, V.	739
Ferrando, A.	73, 404, 604
Ferrando, J.	129
Ferraz, C.M.	97
Ferrer, J.	37
Ferrer, L.M.	810, 813, 822
Ferrer, P.	141, 189
Ferret, A.	31, 252
Fievez, F.	288
Figueras, L.	813, 822
Figuroa, J.	165
Filali, H.	768
Fina, M.	526
Flores, C.	94, 816
Flores, J.	103
Folch, J.	338, 371
Folch, J.M.	523, 562, 565, 568, 571, 574
Fondevila, J.	813
Fondevila, M.	153, 258, 854, 885

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Forcada, F.	100, 341, 344, 368	Garrido-Novell, C.	640
Fortea, C.	658	Garrido-Varo, A.	192, 631, 640
Fortes, M.R.S.	574	Gartziandia, A.	810, 813
Fouladi-Nashta, A.A. ...	365	Garza, M.C.	765, 768
Fraile, L.	583	Gasa, J.	34, 138
Francesch, M.	156	Ghafari, F.	365
Francisco, I.	795	Ghaffarilaleh, V.	365
Francisco, R.	786	Giménez, I.	425
Franco, D.	180	Gimeno, A.	258, 303, 306, 309, 854
Franco, R.	150	Giráldez, F.J.	216, 282, 682, 685
Frikha, M.	237	Giraldo, L.A.	186, 270
Frutos, P.	210, 213, 845, 857, 860	Girdwood, S.E.	857
Fuertes, C.	398	Girón, W.	768
Fugita, C.A.	619, 622, 625	Gispert, M.	85, 88
Gallardo, B.	249, 667, 670	Godoy, M.	712
Gallardo, D.	544	Gol, S.	520
García F.J.	751, 754	Gómez, D.	789, 795
García- Rodríguez, A. .	279	Gómez, E.	141
García, A.	294	Gómez, E.A.	64, 79, 425
García, D.	598	Gómez, I.	613, 730
García, J.	198, 201, 225, 231, 234, 882	Gómez, M.	604
García, J.J.	261, 273	Gómez, N.C.	73
García, M.	875, 877	Gomez-Conde, M.S. ...	201
García, M.L.	317, 460, 463	Gómez-Fernández, J. .	135, 168, 171, 437, 440
García, O.	712, 733	Gómez-Izquierdo, E. ...	135, 168, 171, 437, 440
García, W.	401, 404	Gómez-Romano, F.	589
García-Casco, J.M.	577	Gonzales-Barron, U. ...	646, 649
García-Cortés, L.A.	508	González, A.	487
García-Gámez, E.	535	González, D.	395
García-García, R.M.	195, 514	González, J.M.	810, 813, 822
García-Ispierto, I.	323, 819	González, L.	643
García-Rebollar, P.	195, 243	González, R.	541
García-Rodríguez, A. ..	267	González-Arto, M.	413
García-Torres, S.	697, 739	González-Calvo, L.	219, 556, 634
García-Vázquez, F.A. ..	386, 389	González-Martín, S.	88
Garrido Novell, C.	637	González-Ortiz, G.	872
Garrido Varo, A.	637	González-Recio, O.	490, 493, 502, 505
Garrido, M.D.	628		
Garrido, V.	825, 828		

AUTORES	Páginas
González-Rodríguez, A.	499
González-Rojo, S.	431
González-Villalobos, D.	407
Goyache, F.	595, 598
Gracia, A.	658
Grassi, P.	85, 88
Grilló, M.J.	828, 831
Guada, J.A.	129, 153
Guedes, C.	25
Guerra-Rivas, C.	249, 670
Guerrero Ginel, J. E.	192
Guerrero, A.	622, 661
Guerrero, J. E.	637
Guerrero-Ginel, J. E.	631, 640
Guillamón, E.	135, 171
Guillén, R.	100
Gutiérrez, A.	79
Gutiérrez, J.P.	514
Gutiérrez-Gil, B.	532, 535
Gutiérrez-Valcárcel, A.	478
Guzmán, P.	159, 222, 225, 228, 231, 234
Guzmán-Pino, S. A.	165
Hajji, H.	183
Hammami, S.	359, 363, 679
Haro, A.	144, 652
Harzalli, R.	228, 231
Hedman, C.	765, 768
Henríquez, E.	517
Heras, A.	882
Hernández, J.	541
Hernández, J.A.	789, 795
Hernández, M.	374, 392
Hernández, P.	466
Hernández, R.	765, 768
Hernández-Caravaca, I.	389
Herráez, M.P.	431
Herraiz, P.	261
Herrera-León, R.F.	422
Hervás, G.	210, 213, 845, 857, 860
Horcada, A.	661

AUTORES	Páginas
Horcas, E.	748
Humada, M.J.	736, 751, 754
Ibáñez, N.	562, 571
Ibáñez-Escriche, N.	460, 484, 523, 526
Iglesias, A.	22
Iguácel, L.P.	547
Indurain, G.	730
Insausti, K.	559, 613, 730
Ipharraguerre, I.	300
Ipharraguerre, I. R.	162
Isabel, B.	132, 553
Izquierdo, D.	359, 362
Izquierdo-Rico, M.J.	389
Jaroso, R.	742, 745
Jiménez, E.	845
Jiménez, F.	294
Jiménez, L.	718
Jiménez, M.A.	454
Jiménez-Montero, J. A.	445, 448, 493, 490
Jordana, J.	73, 404, 544, 604
Joven, M.	153
Joy, M.	219, 547, 556, 634, 721
Juan, T.	721
Jurado, J.J.	454
Kim, M.	640
Kimiaetalab, M. V.	177, 225, 234
Kirinus, J.K.	547
Lacasta, D.	810, 813, 822
Lachica, M.	144, 174
Lahoz, B.	371
Landi, V.	604
Langeveld, J.	765
Lara, L.	144
Lasarte, M.	592
Latorre, M.A.	129, 153
Lauzurica, S.	664, 673, 676, 706
Lavara, R.	481
Lavín, M.P.	670

AUTORES	Páginas
Lavín, P.	249, 742, 745
Lázaro, R.	243
Lecomte, T.	595
Legarra, A.	508, 592
Leite, A.	709, 724, 727
Leroux, C.	210, 213
Letosa, A.	879
Letosa, J.	879
Lewis, K.	866
Liébano Hernández, E.	792
Lizardo, R.	156
Llorente, P.	282
Lopes, S.	19
López Arellano, M.	792
López, A.	697, 739
López, O.	664, 673, 676, 706
López, S.	216
López-Bote, C.J.	132, 237, 553
López-Gatius, F.	323, 819
López-Luna, J.	655
López-Nuez, P.	135, 171
López-Úbeda, R.	383, 386
Lorenzo, C.	434
Lorenzo, J.M.	180
Lorenzo, L.	598
Lorenzo, P.L.	195, 514
Losa, R.	288
Loste, A.	810
Lucientes, J.	801
Luna-Valiente, C.	410
Luño, V.	386
M.A., Palacios	715
Mahouachi, M.	183
Mainar-Jaime, R.C.	825
Majolini, D.	882
Mallo, J.J.	150
Mandalawi, H. A.	177, 222, 228
Mandaluniz, N.	267
Mangado, J.M.	70
Manrique, E.	124
Manso, T.	249, 667, 670

AUTORES	Páginas
Manteca, X.	34
Mantecón, A.R.	249, 670, 742, 745
Manuelian, C.L.	207
Manunza, A.	541, 604
Manzanilla, E.G.	147
Marca, C.	810, 813
Marco, M.	204
Marco-Jimenez, F.	481
María, G.A.	46, 49, 52, 760
Marijuán, S.	267
Marín, B.	765, 768
Marín, C.M.	834
Martín de la Rosa, A.	514
Martín-Diana, A.B.	273
Martínez Fernández, A.	291
Martínez Valladares, M.	532
Martínez, A.	604
Martínez, A.M.	571
Martínez, B.	628
Martínez, D.	129
Martínez, G.	255, 866, 842
Martínez, M.	141
Martínez-Álvaro, M.	460
Martínez-Fernández, A.	28, 297
Martínez-Fernández, G.	285, 863
Martínez-Pastor, F.	398, 431, 434
Martínez-Pérez, J.M.	780, 783
Martínez-Soto, J.C.	380
Martínez-Valladares, M.	780, 783
Martínez-Vallespín, B.	885
Martín-García, A. I.	246, 255, 276, 285, 842, 845, 863, 866,
Martín-Orúe, S.M.	872
Mata-Campuzano, M.	398, 434
Matás, C.	380, 383, 386, 389
Mateo, J.	682, 685, 751, 754
Mateos, G. G.	159, 177, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 243

AUTORES	Páginas
Mateos, I.	851
Maurício, R.	350, 353, 356
Maza, M.T.	658
McEwan, N.R.	857
Medel, I.	700, 703
Media, B.	288
Medina, I.	106, 109
Meikle, A.	344
Mejía-Silva, W.	774
Melo, C.	544
Mendes, C.	22
Mendizabal, J.A.	559, 613, 643
Mendoza de Gives, P. ..	792
Menéndez-Buxadera, A.	451
Meneses, C.	499, 529
Menoyo, D.	162, 177, 237, 882
Mercadé, A.	541
Mereu, A.	300
Mesas, L.	150
Miguélez, S.	786
Milán, M.J.	73, 94
Millán, P.	195
Mínguez, C.	469, 475, 478
Mintegi, L.	592
Miranda, M.A.	801
Miranda, R.	875, 877
Miranda-de la Lama, G.C.	46, 49, 52, 760
Mocé, E.	425, 428
Mocé, M.L.	457
Mocket, J.H.	85, 88, 91
Molina, A.	451
Molina, R.	801
Molina-Alcaide, E.	255, 276, 285, 842, 848, 863
Molino, F.	219, 556, 634, 721
Monge, P.	619, 703
Monleón, E.	765
Monroy, F.	771
Montero, M.	407
Monzón, M.	765

AUTORES	Páginas
Mora, J.	61, 264
Morán, L.	216, 682, 685
Morán-Lobato, L.	783
Morató, R.	359, 362
Morazán, H.	61, 106, 109, 264, 869
Moreno, C.	487, 499
Morgavi, D.	288
Moros, R.	55
Moset, V.	141, 189, 888
Mouresan, E.F.	487, 499
Mozo, R.	338
Muela, E.	619, 694, 700, 703
Muelas, R.	317, 463
Muño, I.	664, 673, 676, 706
Muño-Blanco, T.	368, 410, 413, 422
Muns, R.	34
Muñoz, F.	183
Muñoz, M.	523, 577
Muñoz, P.M.	831, 834
Muñoz-Martínez, A.	848
Murilhas, A.M.	798
Muzquiz, M.	135, 171
Naharro, G.	875, 877
Naranjo, N.	237
Nava-Trujillo, H.	395, 419
Newbold, C.J.	288, 866
Nicodemus, N.	204
Nicoloso, C.S.	97
Nieto, R.	652
Nogales, R.	276
Nogareda, C.	323
Noguera, J.L.	562, 574
Núñez, C.	288
Obregon, V.	177
Olaizola, A.M.	124
Oliete, B.	718
Oliva, P.	61, 264
Oliván, M.	739

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Olivares, A.	628	Pérez Marín, D.	637
Oliveira, A. F.	709, 724, 727	Pérez, C.	664, 673, 676, 706
Oliver, A.	789	Pérez, J. A.	28
Oliver, M.A.	628	Pérez, J. F.	147, 150, 165
Olleta, J.L.	46, 49, 52, 616, 625, 661, 703, 760	Pérez-Baena, I.	79
Olmedo, S.	273	Pérez-Bonilla, A.	225, 228, 231, 234
Olmos, A.	888	Pérez-Cabal M.A.	451
Ornaghi, M.G.	622	Pérez-Guzmán, M.D. ..	451, 718
Oropeza, V.	801	Pérez-Marín, D.	192, 631
Ortega, M.	810, 813, 822	Pérez-Marín, D. C.	640
Ortín, A.	810, 813	Pérez-Montarelo, D.	565, 571
Ortiz de Montellano, A.	792	Pérez-Pe, R.	368, 410, 413
Osorio, C.	395	Pérez-	
Óvilo, C.	132, 553	Santaescolastica, C. ...	664, 673, 676, 706
Paço, S.M.	43	Pérez-Velasco, L.	547, 556
Pagés, N.	801	Peris, C.	79
Palacín, I.	341, 416	Picot, A.	374
Palacio, J.	37	Piedrafita, J.	526
Palacios, C.	76, 326	Piles, M.	472
Palacios-Aguado, A.	398	Pilla, F.	604
Palomo, M.J.	401, 404	Pinal-Prieto, R.	801
Panea, B.	688, 691	Pineda-Quiroga, C.	267
Panella-Riera, N.	628	Pintos, M.E.	153
Paramio, M.T.	359, 362, 365	Piñeiro, P.	786, 789
Pascual, J.I.	195	Pires, P.	757
Pascual, M.	64	Pires-Sância M.A.	798
Pascual-Alonso, M.	46, 49, 52, 760	Pitarch, J.L.	765, 768
Pastor, F.	374, 392	Pollott, G.	538
Pau, V.	613	Pons, A.	604
Paulos, K.	709, 724, 727	Portillo, M.G.	774
Paz-Silva, A.	795	Portillo-Guevara, O.	407
Peiró, R.	317, 320, 457	Posado, R.	261, 273
Pena, R.N.	517, 520, 541, 544, 562, 568, 580, 583	Prado, I. N.	625
Penedo, I.	22	Prado, I.N.	619, 622
Peñacoba, M.	434	Prieto, N.	216
Pereira, E.	709, 724, 727	Prior, E.	697, 739
Pérez Bonilla, A.	222	Próspero, F.	28, 297
Pérez de Rozas, A.	882	Puig-Oliveras, A.	523, 565, 568
		Pumarola, M.	768

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Purroy, A.	559, 613, 643	Rodríguez, L.A.	273
Quintanilla, R.	541, 544	Rodríguez, M.	79, 243
Quintero, A.	294	Rodríguez, M.C.	511, 577, 601
Quintero-Arboleda, X.	529	Rodríguez, M.I.	789
Quintero-Moreno, A.	395, 407, 419, 774	Rodríguez-Ortega, T. ...	121
Quintín, F.	371	Rodríguez-Ramilo, S.T.	493, 607
Quintín, F.J.	374, 392	Rodríguez-Romero, N.	885
Rafel, O.	472	Rodríguez-Sánchez, J.A.	112, 115, 118, 329, 332, 335
Ragab, M.	475, 478	Rojas Cano, M.L.	144, 174
Ramayo-Caldas, Y.	523, 565, 568, 574	Rojas, N.	294
Ramon, J.	472	Rojas-Olivares, M.A. ...	85
Ramón, M.	451	Rojo-Vázquez, F.A.	780, 783
Ramos, J.J.	810, 822	Romaguera, R.	362
Ramos-Morales, E.	246, 255, 285, 863, 842, 845	Romar, R.	377, 380
Ranilla, M.J.	186, 270, 851	Romasanta, A.	786
Realini, C.E.	613, 616	Romero, A.	768
Rebollar, P.G.	195, 514	Romero, C.	198
Redondo-Blanco, S.	398	Romero-Huelva, M.	276
Resconi, V.	619	Roncalés, P.	694
Resconi, V.C.	748	Rosa, J.S.	97
Restrepo-Rubio, N.	422	Ros-Freixedes, R.	517, 520, 580
Reverter, A.	574	Roura, M.	362
Revilla, I.	715	Rovai, M.	207, 816
Revilla, M.	523	Rubio, B.	667
Rey, A.	237	Rubio, P.	875, 877
Rey, A.I.	132, 553	Rubio-Guillén J.	395, 407
Ripoll, G.	219, 547, 556, 634, 643, 688, 691	Rueda, J.	529
Ripoll-Bosch, R.	121	Rueda-Alfonso, F.L.	422
Rivas, E.	338	Ruiz de Arcaute, M.	810, 813, 822
Rivas-Cañedo, A.	673, 676, 706	Ruiz, R.	267
Robles, V.	431	Ruiz-Arrondo, I.	801
Robles-Pérez, D.	780, 783	Ruiz-Ramírez, J.	712, 733
Rodrigáñez, J.	3	Saavedra, M.D.	377
Rodrigues, E.A.	156	Salama, A.A.K.	82, 94, 207, 679, 816
Rodrigues, S.	709, 724, 727	Salama, O.H.	82
Rodríguez, C.	571	Saldaña, B.	159, 225, 228, 231, 234
Rodríguez, J.R.	58	Salido, V.	801
		Samper, S.	825
		San Román, B.	828, 831

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Sánchez, A.	85	Sidrach de Cardona, S.	234
Sánchez, D.	463	Sidrach, S.	225
Sánchez, J. P.	469, 472, 475, 478, 484	Silió, L.	3, 511, 571, 577
Sánchez, M.	804, 807	Silva, A.	25
Sánchez, P.	371	Silva, C.	34
Sánchez, S.	828	Silva, S.R.	19, 25, 40
Sánchez, W.	303	Silveira, V.C.P.	97
Sánchez-Andrade, R. ..	786, 789	Silvestre, M.	19, 25, 40
Sánchez-Briñas, B.	742, 745	Siurana, A.	252
Sánchez-Murillo, J.M. .	801	Smeti, S.	183
Sánchez-Quinche, A. ..	79	Sol, C.	138
Sanchís, J.	786	Solà-Oriol, D.	150, 165, 872
Sanjuán, D.	715	Soldado, A.	291, 297
Sansano, S.	425	Soldevila, C.	103
Santacreu, M.A.	320, 457	Soler, J.	85, 88
Santolaria, P.	416	Soret, B.	559
Santos, V.	25	Soriano-Úbeda, C.	389
Sanz, A.	112, 115, 118, 329, 332, 335, 374	Sosa, C.	344
Sañudo, C.	661, 616, 619, 622, 625, 700, 703, 748, 760	Soto, S.	682, 685
Sarasa, R.	768	Soulas, C.	592
Saro, C.	186, 270, 851	Stella, A.	538
Sarriés, M.V.	613	Suarez, J.	153
Sarriés, V.	730	Suárez, J.L.	786, 795
Sarto, P.	547, 556, 771	Suárez-Belloch, J.	129
Sato, V.A.	622	Suarez-Vega, A.	535
Saura, M.	601	Such, X.	679
Segura, J.	132	Tabarez, A.	401, 404
Seradj, A.R.	61, 106, 109, 240, 264, 869	Tabernero de Paz, M.J.	261, 273
Serradilla, J.M.	451	Tamboura, H.H.	595
Serraller, J.M.	392	Tarsitano, M.A.	628
Serrano, E.	58, 754, 736, 751	Tazzoli, M.	882
Serrano, M.	451, 547, 556	Teixeira, A.	709, 724, 727
Serrano-Blesa, E.	410	Tejerina, D.	697, 739
Serrano-Pérez, B.	323	Tejido, M.L.	273, 82
Sevilla, E.	371, 374, 392	Tenas, J.	694
Shearer, A.	288	Terre, M.	404
		Tessier, N.	288
		Tibau, J.	85, 88
		Tomás, C.	135, 168, 171, 425, 437, 440
		Tor, M.	517, 520, 580
		Toral, P.G.	210, 213, 857,

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
	860	Vico, J.P.	825
Toro, M.A.	508, 586, 601, 607	Vidal, E.	768
Torrallardona, D.	156	Vidal, O.	604
Torrecilhas, J.A.	622	Vieira, C.	667, 670
Torres-Pitarch, A.	141	Vijil, E.	374
Torres-Rodríguez, P. ...	407	Vilallonga, D.	804, 807
Traoré, A.	595	Vilarinho, M.	757
Trocino, A.	882	Villagrà, A.	141
Trujillo, M.	774	Villalba, D.	61, 264
Tutusaus-Batlle, J.	819	Villanueva, B.	586, 589, 601
Ugarte, E.	505, 550, 592	Villanueva, M.	70
Uriarte, J.	777	Villarroel, M.	46, 49, 52, 655
Urrutia, O.	559	Villorbina, G.	240
Valcárcel, F.	804, 807	Virla, J.	774
Valentim, R.	347, 350, 353, 356	Vitezica, Z.G.	550
Valério M.J.	798	Viudes de Castro, M.P.	428
Valero, M.V.	619, 622, 625	Vivar-Quintana, A.M. ...	715
Varela, A.	135, 171	Worgan, H.J.	857
Vargas, A.F.C.	97	Xavier, C.	649
Varona, L.	487, 499	Xiccato, G.	882
Vázquez Prats, V.	792	Xuriguera, H.	88
Vázquez, F.	768	Yániz, J.L.	416
Vázquez, M.I.	341	Yáñez-Ruiz, D.	246, 866
Vega, S.	192	Yáñez-Ruiz, D.R.	255, 285, 288, 839, 842, 845, 854, 863, 869
Velásquez, A.	407	Zabalza, A.	831
Velásquez-Penagos, J.G.	422	Zabalza-Baranguá, A. .	828
Venâncio, D.	350	Zalahne W.	407
Venturini, G.	529	Zammerini, D.	628
Vera, G.	31	Zamora-Rojas, E.	631
Verdú, M.	312	Zamudio, A.	124
Vergara, I.	70	Zapata, D.	774
Vicente, F.	28, 291, 297	Zawadzki, F.	625
Vicente, J. S.	481	Zidi, A.	544
Vicente-Fiel, S.	416	Zomeño, C.	466

Genética

LA FORMACIÓN DE LAS RAZAS AUTÓCTONAS ESPAÑOLAS DE GANADO VACUNO

R. Alenda y J. A. Jiménez-Montero
Dpto. de Producción Animal. ETSI Agrónomos. UPM. 28040, Madrid
E-mail: rafael.alenda@upm.es

INTRODUCCIÓN

Las razas se forman combinando cruzamientos y selección dentro de un proceso continuo y dinámico que da lugar a su evolución.

Para este trabajo, se ha realizado una investigación basada en documentación publicada desde finales del siglo XVIII que permite aportar conocimiento sobre dicho proceso. El objetivo de este trabajo es reflejar estas fuentes históricas y realizar una descripción resumida del conocimiento que existe sobre la formación de las razas españolas de vacuno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primeros antecedentes. Las virtudes de las razas creadas en Inglaterra con un mayor crecimiento y calidad de la carne en los siglos XVIII y principio del siglo XIX se propagaron por todo el mundo. España está inmersa en dicho proceso existiendo referencias de la divulgación realizada por ilustrados españoles entre 1797-1808 (1). Sin embargo, no se ha encontrado documentación sobre la repercusión de los logros de la ganadería inglesa en España anteriores a 1850. Por tanto, es necesaria una investigación más profunda anterior a esta fecha. Sí se han encontrado documentos posteriores que hablan del uso de dichas razas extranjeras durante dicho periodo, por ejemplo Arce (3 y 5) y Frias y Casado (3), en la que se afirma de que: “los cruces con las razas extranjeras durante un siglo no han producido los resultados deseados” y que “no es partidario de los cruzamientos” respectivamente (7). Era generalizado el concepto de que en España no existían razas apropiadas ni para el trabajo ni para la producción cárnica o láctea (2). La única “aptitud que se cultivaba con esmero alcanzando notable perfección era la bravura”. Los intentos de fomento de las razas vacunas se basaban en el establecimiento de las paradas de sementales (de propiedad municipal y en algunas zonas, privadas pero con control oficial), concursos y la comparación en centros de experimentación del cruce de razas importadas con razas locales. Diversas publicaciones (desde el siglo XIX) recomiendan estudios sobre adaptación de los animales a los recursos disponibles o simultanear el fomento de los recursos forrajeros y el ganadero.

Las razas existentes en España en el siglo XIX (3 y 4). El tipo de animal que poblaba la península era un animal pequeño cuyas hembras pesaban alrededor de los 275-300 kg y con primer parto a los cuatro años. Los sementales alcanzaban un 20% más de peso. Predominaban los animales bravos en casi todas las regiones de España (3). En las sierras, solía haber un ganado al que se denominaba Serrano, del País, Terreño o Morucho según zonas. Existen excepciones de este concepto generalizado. Por ejemplo, la producción de animales de más formato con destino al trabajo en la zona de Barco-Piedrahita-Salamanca que eran utilizados en diversas regiones como por ejemplo en las paradas de sementales de los ayuntamientos de Orense (Vega del Bollo, Viana, Gudiña y Manzaneda). Allí se cruzaban con las vacas tanto de origen portugués como gallego para obtener animales para el trabajo (3 y 4). Dando lugar a nuevos morfotipos, por ejemplo, en el concurso nacional de 1927 se presenta 1 toro que el jurado califica como subraza de Ginzo de Limia con caracteres que le diferencia de la raza Gallega (4 y 8). Paralelamente, en Murcia existen las razas cristiana, Lorquina y Musulmana para trabajar en la huerta. A través de los puertos mediterráneos como el de Cádiz se producía tránsito de animales con África (4 y 6).

En toda la cornisa cantábrica se realizaban cruzamientos con razas que mejorasen la producción de leche, procedentes de Holanda (frisona) y Suiza (Pardo Alpina, llamada en España Schwitz). La raza Suiza se utiliza de una forma continuada en las paradas de sementales desde Galicia hasta el pirineo catalán durante más de un siglo (1860-1980). El objetivo era obtener vacas de triple aptitud (carne, leche y trabajo) en las explotaciones minifundistas. Este proceso conlleva tanto la desaparición de razas existentes (Cantabria) como una fuerte influencia en las que perduran (3, 4 y 6). A mediados del siglo XIX se desarrollan explotaciones en las ciudades de más de 10.000 habitantes para la venta directa de leche, la raza holandesa desplaza al resto tanto locales como importadas en estas áreas. Cantabria importa frisona y suministra a otras zonas a través del mercado de Torrelavega.

Las Razas existentes en España en la primera mitad del siglo XX. (6, 7, 8). En 1917, los pesos de las hembras ya superan los 400 kg y los machos y bueyes los 500kg con alzas entre 135-150cm en la zona de dehesa. La descripción de las razas existentes no se diferencia significativamente a la que se tenía en el siglo XIX.

El Instituto Agrícola Alfonso XII y las Granjas agrícolas, distribuidas por España tienen influencia en las razas españolas durante este periodo. Las actas de los concursos de ganado locales, provinciales y nacionales realizados entre 1910 (La Coruña) y 1930 son una buena fuente de información para el conocimiento de las razas existentes y su evolución. Por ejemplo, en 1950, dentro de la primera feria del Campo celebrada en Madrid, se presentan sementales que superan los 1000Kg de peso vivo que si se parecen a las razas autóctonas actuales. Al igual que en siglo anterior, los concursos y las paradas de sementales siguen siendo los métodos para mejorar la ganadería. En estas paradas se realizan los primeros esfuerzos para controlar la genealogía de los sementales especialmente en La Coruña y más exhaustivamente en Guipúzcoa, creándose unos libros genealógicos en los primeros años del siglo XX. Para la producción de leche en el norte, se consolidan las razas frisona y pardo alpina. Pero en los años veinte se introduce la raza Holstein (por la Granja Ventosilla) Estos animales tendrán influencia posteriormente en las Granjas agrícolas de Valladolid y Aranjuez. No será hasta los años 60 cuando la importación de novillas y semen congelado de dicha raza sea sistemática.

Segunda mitad del siglo XX. En los años 60 se importan animales de raza Hereford, Angus, Charoles, Santa Gertrudis y South Devon (7). Esta última raza fue utilizada en Galicia y las otras en zonas de la meseta. En dicho periodo se vuelve a mencionar que el mercado español requiere carnes magras sin grasa (Ochoa, 1970, 7). Por ello se fomenta la utilización de los animales "culones". Las razas francesas Charoles (Talagon, 1970, 7), primero y unos años más tarde la Limusín alcanzan popularidad en España y las razas de origen anglo-sajón desaparecen.

Origen de las razas actuales.

Raza Gallega (3, 4, 6, 9, 10): La raza Gallega se clasificaba en función de su capa y origen Bermella (o Teixa) y Marela, la primera de ella se encontraba en los valles y la segunda en las zonas montañosas. La vaca Bermella era de mayor tamaño y mayor producción de leche. Sin embargo, en el concurso Nacional de 1927 se afirma que no es posible diferenciar entre las dos procedencias. Dado que la venta del ternero era base de la economía del ganadero que era vendidos en Madrid y Barcelona (ferrocarril).El cruce, de un 20% de mas valor, con la raza Simmental fue muy popular, se estima que en las paradas se realizaron unas 600.000 montas durante la primera mitad del siglo XX, además de las montas con sementales de particulares hasta al menos 1966. Desde 1926 hasta 1955 se fomenta la selección de la raza gallega para la producción de leche (Misión Biológica, Diputación de Pontevedra (1926-1930), Plan Agrícola de Galicia (9) y Diputación de Lugo (10). En el momento de la creación de su libro genealógico es una mezcla de animales Bermello, Marelo, Simmental y Pardo Alpino. Existen documentos donde se reconoce que el mejor semental del programa existente en Lugo estaba influenciado por la raza Simmental, ya que su capa poseía manchas blancas. A esta influencia puede deberse que algunos sementales alcanzasen ya los 1000kg. de peso a mediados del siglo XX.

Raza Asturiana (3, 4, 6, 8): En Asturiana se menciona la raza de los valles y de la montaña (Casina). Asturias occidental y el norte de Lugo poseen escasa separación ganadera, por tanto las razas Pardo Alpina y Simmental también están presentes en Asturias La raza de los valles esta muy influenciada por la Pardo. La presencia de la raza Simmental estuvo presente al menos hasta 1923. Por ejemplo en el concurso de 1920 de Avilés se presentaron 21 ejemplares de ganado del país, subraza de los Valles, 7 de ganado raza Simmental, 11 de raza Schwitz y 15 vacas y novillas cruzadas de ganado del país con la raza Simmental y 13 con la raza Schwitz (6).

Raza Tudanca (3, 4, 6, 8): En Cantabria se mencionan las razas Pasiiega, Tudanca, Campurriana y Campoo. Fueron cruzadas por la Pardo Alpina desapareciendo todas excepto la Tudanca. Así, en el concurso nacional de 1927 se presentaron sólo animales Tudancos. La raza frisona es mas utilizadas que en otras regiones de la cornisa cantábrica.

Raza Pirenaica (4, 6, 8 y otras publicaciones, Gallastegui, 11): La raza Pirenaica es promovida simultáneamente a la raza Pardo Alpina, en diversas épocas del siglo XX se menciona su desaparición. En Guipúzcoa desde su Diputación se promueve por ser los

mejores la raza Schwitz-guipuzcoana. Navarra y Vizcaya poseen una evolución paralela desde sus Diputaciones, aunque se ha encontrado un menor número de publicaciones.

Raza Terreña (8): Desde mediados del siglo XIX hasta 1917 se menciona su explotación en la provincia de Álava, para reproducción y cruzada con Schwitz para la producción de leche alcanzando 1987 litros.

Raza Avileña (4, 6, 8): La raza Avileña esta representada en los concursos nacionales y locales entre 1913 y 1930. En los inicios, se menciona la presencia de animales cruzados (fuera de concurso) y puros, incluyendo las subrazas de Piedrahita y Barco de Ávila. En algunas actas de los primeros concursos se menciona que no se permite concursar a animales presentados por los ganaderos Ramírez y Félix de Gregorio. Sin embargo, un tiempo después, a finales de los años 20, estos ganaderos ganarían los premios mas importantes al obtener las más altas puntuaciones morfológicas, sus animales eran de un mayor tamaño, y estaban considerados como perfeccionados. Según Sanchez Belda el ganadero Ramírez había realizado cruces con animales de raza andaluza (concurso nacional 1930)., cuando no hay evidencia del aporte de una mejor conformación y tamaño Durante este periodo, desde la Granja Agrícola AlfonsoXII se recomendaba el cruce con la raza Sussex (raza de capa negra) en aquellas zonas con pobre calidad de pasto, y existían ejemplares de dicha raza procedente de dicha granja en las paradas de sementales de La Moncloa, Torrelaguna, Talavera, Ciudad Real y Córdoba (11).

Raza Retinta (4, 6, 8): La presencia de razas extranjeras en Andalucía y Extremadura es constante. La influencia americana e inglesa promueve los cruzamientos, Civantes (6) menciona los buenos resultados de los cruces de la raza retinta con la raza Durham (capa roja), destacándose la vaca Guadianera con una alzada de 138cm y peso de 400-450 kg, para la producción de carne. Los cruzamientos de la Retinta con la raza Durham es parte de una sección en los concursos nacionales de los años 20. Existe amplia documentación sobre cruzamientos durante el siglo XX (7).

CONCLUSIONES

Se aportan evidencias sobre la formación de las razas vacunas españolas no reflejadas en publicaciones recientes. Debe de existir documentación no consultada, (E.g. Granjas Agrícolas 1890-1930 o Diputaciones) que aportarán más información sobre el origen de nuestras razas. Cuando las existentes no eran rentables se realizaban cruzamientos en cualquier tipo de ganadería y especie. Actualmente diversas razas españolas carecen de productividad por hembra, conformación y de calidad de carne (marmoleo). El cruzamiento permitiría mejorar estos caracteres más rápidamente que la selección en pureza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Las fuentes consultadas se encuentran en las bibliotecas de ETSIAM, EUTAM, Centro de Investigación Mabegondo (La Coruña), CSIC, Salcedo (Pontevedra) y virtual del MARM. • 1-Semanario de Agricultura y artes dirigidos a los párrocos, 1797-1808. • 2-Revista Mensual de Agricultura 1850-1854. • 3- La Crisis Agrícola y Pecuaria 1887. • 4-La ganadería en España. Avance sobre La riqueza pecuaria en 1891. • 5-Instituto Agrícola de Alfonso XII memoria. Jose de Arce 1892. • 6-Concursos de Ganados 1913-1930 (diversas publicaciones). • 7-Revista Agricultura, revista 1928-1975. • 8-Estudio de La ganadería en España 1917 (publicado en 1922). • 9-Estudio Del ganado vacuno gallego y posibilidad de su mejora. C.Fernandez-Quintanilla.1947. •10-Fomento y mejora Del ganado vacuno. Junta Coordinadora de La mejora ganadera. Fierro 1962. • 11-Biblioteca Virtual MARM

ORIGINS OF SPANISH CATTLE LOCAL BREEDS

ABSTRACT: The development of livestock breeds is a dynamic process of selection and cross-breeding. There are many documents of the influence of foreign breeds in Spain during the last two centuries. Those documents have not been used in recent publications related to the origin of the current Spanish cattle breeds. Using crosses to accelerate genetic progress of local breeds should be accepted in addition to the selection, as it has historically been.

Keywords: Local breeds, cross-breeding, Spanish history.

OBJETIVOS DE SELECCIÓN EN VACUNO DE CARNE EN FUNCIÓN DE SUS REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS Y DE LA DISPONIBILIDAD DE PASTO

de Paz-del Río, R.*, Jiménez-Montero, J.A., Daza, A. y Alenda, R.
Departamento de Producción Animal. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
Ciudad Universitaria s/n. 28240 Madrid.
E-mail: raqueldepaz@gmail.com

INTRODUCCIÓN

En un programa de mejora genética para producción de carne en extensivo deben seleccionarse hembras que estén adaptadas a los recursos forrajeros existentes, las necesidades de la cría y las demandas del mercado. Una inadecuada adaptación de las vacas a la disponibilidad de alimento que tienen en su medio de producción se traduce en una mala condición corporal, que a su vez perjudica a la fertilidad.

La adaptación al medio es medida a través de la productividad de la hembra, siendo este carácter un factor limitante de la rentabilidad de las explotaciones. La baja fertilidad de la cabaña de vacas nodrizas es la mayor debilidad que presenta el sistema productivo español, ya que en torno al 30% no pare cada año (Jiménez-Montero *et al.*, 2011).

En este trabajo se analizó la disponibilidad de pasto frente a los requerimientos energéticos en unidades forrajeras leche (UFL) de las vacas en función del mes de parto, la producción de leche, las necesidades del ternero y su peso vivo adulto (PV). El objetivo fue determinar las necesidades de suplementación en cada caso, requisito previo para optimizar tanto el sistema productivo como los programas de mejora genética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder determinar las necesidades de suplementación se partió del pasto disponible en una dehesa con una producción media anual de unos 1.308 kg MS/ha, en la que hay un 20% de pasto sobrante que se consumirá durante los meses estivales, y que unas 400 UFL/vaca y año se destinan a henificado. Todo ello supone anualmente una disponibilidad real de pasto de unas 2.136 UFL/vaca y año, suponiendo una carga ganadera de 0,4 vacas/ha. Los parámetros productivos de la dehesa fueron definidos a partir de los trabajos de Sanz y Ovejero (1985), Olea *et al.*, (1989), Alibes y Tisserand (1990), López Carrasco *et al.* (1990), Daza (1999), Espejo *et al.* (2000), Sauvant *et al.* (2004) e INRA (1998 y 2007).

Por otro lado, se calcularon las necesidades energéticas de las vacas en pastoreo para un peso de 450, 550 y 650 kg PV, según las recomendaciones del INRA (1988) y Agabriel y D'Hour (2007), comparándose las necesidades de suplementación según el mes de parto, el peso de los animales y su producción de leche. Se supuso que los terneros tienen unas necesidades de suplementación sobre el consumo de leche de 2, 8, 21, 42 y 63 UFL/mes, durante su segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto mes de vida (Daza, comunicación personal). Al modificar el peso vivo de las madres se supuso que habría una variación proporcional del peso al nacimiento de los terneros y, por tanto, de sus necesidades de suplementación, con el fin de conseguir, en todos los casos, terneros con características similares y hacer los modelos comparables.

En el caso de la producción de leche, se partió de una curva de lactación estandarizada de 6 meses de duración, con un pico de lactación a los 30 días de unos 8 kg/día y una media de unos 5,6 kg/día (Daza, comunicación personal). También se calcularon las necesidades de suplementación cuando la producción es un 20% mayor, teniendo en cuenta que repercutirá en unas menores necesidades de suplementación del ternero (se supuso que disminuirán unas 10 UFL/mes de media).

Para todos los cálculos de las necesidades energéticas se determinó una condición corporal de 3 y un peso al nacimiento medio de un 6,5% del peso vivo adulto de la madre (Daza, comunicación personal).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comparar las necesidades de suplementación en función del mes de parto, se tomó como referencia una vaca de 550 kg PV, obteniéndose como resultado que el período más favorable se da durante los meses de diciembre, enero y febrero, que requeriría una suplementación de unas 574 UFL/vaca y año, mientras que el período más desfavorable sería el de junio, julio y agosto, ya que supondría unas necesidades de suplementación de

unas 851 UFL/vaca y año (Figura 1), además del heno suministrado. Suponiendo el precio del pienso 0,47 €/UFL, la diferencia entre los partos en el período favorable y el desfavorable es de 130 €/vaca y año.

Al comparar las necesidades de suplementación entre partos durante el período favorable y el desfavorable, de hembras de 450, 550 y 650 kg PV que producen la cantidad de leche descrita o un 20% más, se observa que, cuanto mayor es el peso de las madres y mayor es la producción de leche, mayor es la suplementación necesaria (Tabla 1 y Figura 2). Por tanto, menor será la rentabilidad de la explotación al mantener el estado corporal de las vacas, relacionado con la fertilidad y el peso de los terneros al destete, constantes en todos los modelos propuestos.

Finalmente, si se compara la situación que *a priori* parece más favorable (vaca de 450 kg PV, producción media de leche de 5,6 kg/día y parto en febrero) con la más desfavorable (vaca de 650 kg PV, producción de leche un 20% mayor y parto en agosto), se observa que la diferencia en costes de suplementación con pienso sería de unos 425 €/vaca y año.

De los resultados del estudio se observa que, a medida que se intensifica el sistema de producción (mayor PV de los animales y más producción de leche), aumentan las necesidades, disminuye la adaptación al medio y hay un menor efecto de la época de parto, debido a que es necesario suplementar a los animales durante períodos de tiempo mayores.

CONCLUSIONES

Hay que evitar los partos en verano en la dehesa, ya que concentrarlos en invierno es la opción más interesante para reducir gastos de suplementación. Sin embargo, deberá valorarse la posibilidad de aumentar el período de partos de otoño a primavera en función de la fertilidad de la explotación.

El coste de la suplementación anual es significativo comparado con el precio medio de un ternero al destete (550 €/ternero; Asoprovac, 2013). Además, las necesidades aumentan alrededor de 100 €/vaca parida y año por cada 100 kg de incremento de PV. Una vaca de 650 kg PV pariendo en el período más desfavorable (junio-julio-agosto), tiene unos costes sólo de suplementación similares al valor del ternero destetado. Un alto porcentaje de las vacas nodrizas en la dehesa superan los 650 kg PV, sobre todo las razas de mayor formato y las vacas cruzadas.

Hay que tener en cuenta que en estos valores no se imputan los gastos de suplementación de las vacas que no paren, de las novillas y de los sementales, ni el resto de costes de la explotación, como son los derivados de los problemas al parto, relacionados con el peso.

La producción de leche es medida en un programa de mejora por la valoración genética del efecto materno del peso al destete, y en este trabajo es analizada de un modo simplificado. Se supone una curva de lactación de 8 a 2 kg/día, cuando existen vacas con una menor producción. Las máximas necesidades energéticas de la producción de leche coinciden con el período en que la hembra debe recuperar su ciclo ovárico. Por lo tanto, fertilidad, producción de leche y peso al destete han de ser considerados de forma conjunta dentro del programa, especialmente a la hora de evaluar progenitores de futuras vacas nodrizas.

Dentro de un programa de mejora genética es necesario conocer el sistema de producción antes de recomendar cómo utilizar los valores genéticos aditivo y materno de peso al destete. Se recomienda que el carácter productividad de la hembra sea una prioridad en todos los programas relacionados con la producción de carne en cualquier especie.

Es necesario continuar con este tipo de estudios, incluyendo el resto de caracteres que tienen impacto sobre la rentabilidad, para definir los objetivos de selección de los programas de mejora genética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agabriel, J. y D'Hour, P. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Editions Quae. INRA, 58 - 65.
- Alibes, X. y Tisserand, J.L. 1990. Options Méditerranéennes. Serie B, Etudes et Recherches nº4, CIHEAM, 137.
- Asoprovac. 2013. Lonja Agropecuaria de Extremadura.
- Daza, A. 1999. Monografía Bovis, nº 87, Ed. Luzán, 100.
- Espejo, A.M., Espejo, M. y López, F. 2000. XXV Jornadas Científicas de la SEOC. Teruel, 477-482.
- INRA. 1988. Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Ed. Mundi Prensa, 432.
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Editions Quae.
- Jiménez-Montero, J.A., González-Recio, O. y Alenda, R. 2011. XIV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II, 539-541.
- López

Carrasco, C., Paredes, J. Verdasco, M.P. y Olea, L. 1991. Mejora de pastos mediante fertilización e introducción de especies en la Campana de Oropesa. Toledo. Ed. Servicio de Investigación y Experimentación Agraria. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, 22.

• Olea, L., Paredes, V. y Verdasco, M.P. 1989. Pastos, XX-XXI, 131-156.

• Sanz, E. y Ovejero, I. 1985. Monografía ONE Nutrición (Coordinador Buxadé, C.). Ed. Exclusivas ONE S.A., Barcelona, 32-53.

• Sauvant, D., Pérez J.M. y Tran, G. 2004. Tablas de composición y de valor nutritivo de las materias primas destinadas a los animales de interés ganadero. Ed. Mundi Prensa, 310.

Tabla 1. Necesidades totales de suplementación (UFL/vaca y año) y costes de suplementación (€/vaca y año) para animales de 450, 550 y 650 kg PV, produciendo un 100% y un 120% de leche (PDL), tanto para partos en el período favorable (F; diciembre, enero y febrero) como en el desfavorable (f; junio, julio y agosto).

Suplementación*	100% PDL			120% PDL		
	450 kg	550 kg	650 kg	450 kg	550 kg	650 kg
F UFL/vaca/año	344,59	574,14	801,13	463,67	692,12	915,02
F €/vaca/año	161,96	269,85	376,53	217,92	325,30	430,06
f UFL/vaca/año	629,90	851,29	1064,66	784,43	1005,82	1219,19
f €/vaca/año	296,05	400,10	500,39	368,68	472,73	573,02

*Coste de la suplementación: 0,47 €/UFL pienso.

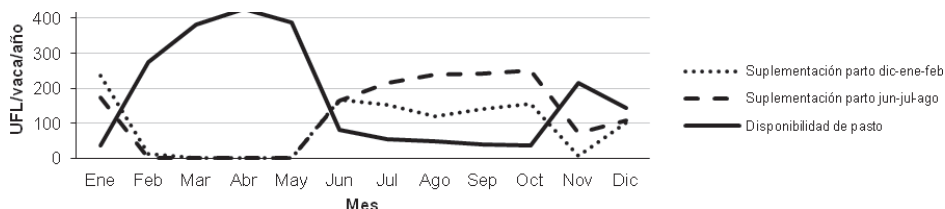
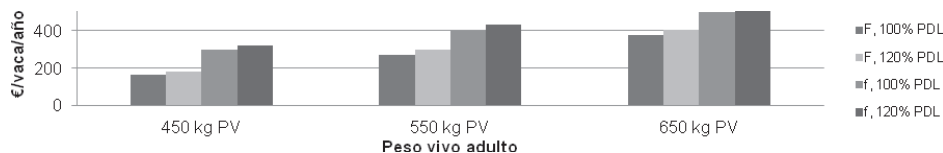


Figura 1. Comparación de la suplementación mensual necesaria entre el período de parto más favorable (diciembre, enero y febrero) y el más desfavorable (junio, julio y agosto), en función de la disponibilidad de pasto.



*Coste de la suplementación: 0,47 €/UFL pienso.

Figura 2. Necesidades totales de suplementación (UFL/vaca y año) y costes de suplementación (€/vaca y año) para animales de 450, 550 y 650 kg PV, produciendo un 100% y un 120% de leche (PDL), tanto para partos en el período favorable (F; diciembre, enero y febrero) como en el desfavorable (f; junio, julio y agosto).

SELECTION OBJECTIVES IN BEEF CATTLE BASED IN THEIR ENERGY REQUIREMENTS AND GRAZE AVAILABILITY

ABSTRACT: In order to determinate which may be the main selection objectives in beef cattle production, it has been analyzed the influence in the energy requirements of calving season, live weight of the cows and milk production, related with the graze availability. The annual supplementation cost is significant, compared with the price of a weaned calf (550 €/calf), and it increases about 100 €/calved cow, year and 100 kg PV gained. A cow with a weight of 650 kg, the current level of milk production and calving in the unfavourable season (june-july-august), has similar supplementation cost as the value of the weaned calf.

Keywords: Beef Cattle, Selection Objectives, Environment Adaptation

ESTRÉS TÉRMICO EN RAZAS AUTÓCTONAS DE RUMIANTES LECHEROS

Carabaño, M.J., Ramón, M., Abo-Shady, H. M., Pérez-Guzmán M.D., Serrano, M., Díaz, C. Molina, A., Menéndez-Buxadera, A., Bahchaga, K., Pérez-Cabal M.A., Serradilla, J.M.

¹Departamento de Mejora Genética Animal. INIA.

Correo electrónico: mjc@inia.es

INTRODUCCIÓN

El umbral de temperatura por encima del cual se produce el estrés térmico (ET) varía con las especies y depende de las condiciones de humedad y viento que acompañan a una temperatura determinada. Los estudios de la repercusión del ET en especies de pequeños rumiantes son escasos. En razas de pequeños rumiantes explotadas en España, los únicos datos existentes son los provenientes de los estudios realizados por Romero et al., (2008) y Menéndez-Buxadera et al. (2012a y 2012b) en razas caprinas y ovinas autóctonas, en los que se constata un efecto del ET sobre la producción y el contenido de grasa y proteína de la leche. Uno de los enfoques adoptado para el análisis cuantitativo de la respuesta al ET se basa en medir la relación entre índices bioclimáticos y los rendimientos productivos y reproductivos recogidos en los controles de rendimiento. El modelo propuesto inicialmente por Misztal (1999) es un modelo de regresión aleatoria de la producción de leche en el día de control sobre el índice de temperatura y humedad, en el que se asume una zona termoneutra de no respuesta a aumentos en temperatura y una zona de descenso productivo lineal a partir de un umbral. La determinación del umbral de tolerancia al ET es pues un paso previo al análisis con estos modelos de regresión aleatoria. El objetivo de este trabajo es determinar el umbral de tolerancia y la respuesta productiva al ET en las razas ovina Manchega y caprina Florida, empleando diferentes variables climáticas indicadoras del efecto del ambiente térmico.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se han utilizado datos del control lechero oficial de las razas ovina Manchega (2000-2010) y caprina Florida (2002-2012) ubicadas en las CC.AA. de Castilla La Mancha y Andalucía, respectivamente, y datos meteorológicos históricos de las mencionadas CC.AA. cedidos por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET). Cada dato productivo se asoció con los datos de temperatura y temperatura con humedad del día del control procedentes de la estación meteorológica más próxima. Para la estimación del umbral de tolerancia y la pendiente de respuesta al ET se utilizaron los siguientes modelos:

$$\text{Manchega: } y_{ijk\text{lmno}} = RA_i + LE_j + DEL_k + Pr_l + TO_m + b \times f(t) + a_n + e_{ijk\text{lmno}}$$

$$\text{Florida: } y_{ijk\text{lm}} = RA_i + ENF_j + TO_k + b \times f(t) + a_l + e_{ijk\text{lm}}$$

donde, RA=Rebaño-Año de control, LE=Número de lactación-edad al control, DEL=Clase de días en lactación, ENF= Edad al control-número de lactación-fase de lactación, Pr=Prolificidad, TO=Turno de ordeño, b=coeficiente de regresión, t=variable climatológica (temperatura, o índice temperatura-humedad (THI)), $f(t)=0$ si $t < T_o$ y $T - T_o$ en caso contrario, T_o = umbral de tolerancia, a=efecto animal con $\text{var}(a)=I\sigma_a^2$, e= efecto residual con $\text{var}(e) = I\sigma_e^2$.

El índice combinado THI se obtuvo mediante la siguiente expresión (Finnochiaro et al., 2005):

$$THI = \{t - [0.55 \times (1 - RH)] \times (t - 14.4)\}$$

, donde t es temperatura en °C y RH es la humedad relativa en tanto por uno.

La resolución de las incógnitas asociadas al modelo (efectos ambientales, efecto animal, coeficiente de regresión y umbral de termotolerancia) se llevó a cabo mediante métodos bayesianos, utilizando como criterio de comparación de modelos el DIC (deviance information criterion).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presenta el número de animales usados en el estudio y las medias productivas en cada una de estas razas. Además de la población total se estudió por separado la subpoblación de animales de más alta producción (aquellos cuya producción por lactación superaban en 1.5 desviaciones típicas la media poblacional).

Tabla 1. Número de animales, controles lecheros y media y percentiles 10 y 90 (en corchetes) de producción de leche, grasa y proteína (g/día) para el total de la población y para animales de alta producción (AP).

Raza	Animales	Controles	Leche	Grasa	Proteína
Manchega					
Total	191.768	1.690.702	1127[472.1964]	79.6[33.4,110.0]	64.8[27.8,135.7]
AP	19.750	204.861	1536[720,2500]	106.5[50.1,169.6]	87.2[42.6,134.7]
Florida					
Total	11.259	116.258	2273[1000.3700]	110.0[51.4,176.8]	74.9[35.16, 120.24]
AP	1.600	27.799	2840[1400.4400]	132.5[67.4, 204.9]	92.3[47.16, 142.2]

En la Tablas 2 y 3 se presentan los resultados del análisis para el umbral de tolerancia y la respuesta al estrés térmico en las poblaciones de raza Manchega y Florida. En la raza Manchega se observan umbrales de tolerancia notablemente más altos (29 °C de temperatura media diaria 39 °C de temperatura máxima) que en la raza Florida (9°C de temperatura media y 22°C de temperatura máxima). Finnochiario et al. (2005) para ovejas Valle de Belice en Sicilia obtuvo un umbral de 23 puntos para THI, que sería equivalente a unos 27°C de temperatura media con una humedad relativa del 40%. En cuanto al impacto del ET en la producción la disminución estimada varía según la variable climática empleada. En la raza Manchega, para la temperatura media en el total de la población se aprecian caídas de producción bajas, pero esta caída sube en el caso de los animales de alta producción, pudiendo llegar a un declive de unos 16g de proteína diaria por cada incremento de un grado por encima de los 29 °C. Para la población caprina, el descenso más acusado fue para % grasa pudiendo descender 0.05 y 0.09 puntos porcentuales por unidad de variable climatológica. Según el criterio DIC, los modelos que usan Tmedia son los que tienden a proporcionar un mejor ajuste (menor valor del DIC) de los datos.

Tabla 2. Media posterior del umbral de tolerancia (T_o), respuesta en producción (b en g/udT) de grasa y proteína a incrementos en temperatura media (T_{media}) y máxima (T_{max}) e índices THI medio y máximo (THI_{max}) y criterio de bondad de ajuste del modelo (DIC,) en la población total y en animales de alta producción (AP,) en la raza Manchega. Los intervalos de máxima densidad 95% se muestran en corchetes.

Grasa	T_{media}		THI_{medio}		T_{max}		THI_{max}	
	Total	AP	Total	AP	Total	AP	Total	AP
T_o	28.8 [28.5.29.1]	29.2 [25.6.32.6]	26.0 [25.8.26.1]	28.0 [25.8.29.9]	39.7 [39.3.40.0]	38.6 [37.4.40.0]	29.1 [29.0.29.3]	33.8 [33.3.34.1]
b	-0.6 [-0.9.-0.4]	-5.8 [-28.5.0.8]	-10.5 [-14.2.-6.7]	-7.4 [-38.1.0.9]	0.9 [0.2.1.7]	-2.1 [-5.7.0.5]	-4.3 [-6.0.-2.8]	-56.0 [-115.3-17.2]
DIC	7642333	957229	7642496	952849	7642369	957610	7642424	957586
Proteína								
T_o	29.13 [28.8.29.4]	29.55 [29.2 .29.9]	25.26 [25.0.25.6]	28.10 [27.8. 28.5]	38.08 [36.9.39.0]	38.40 [37.1. 39.7]	28.11 [27.8.28.9]	33.81 [33.4.34.1]
b	-0.49 [-0.7.-0.3]	-15.85 [-47.7.-1.4]	-5.10 [-7.2 .-3.4]	-15.75 [-24.5.-7.0]	-0.28 [-0.55.-0.1]	-1.93 [-4.4.-0.1]	-1.57 [-2.9. -0.8]	-55.30 [-93.8.-16.5]
DIC	7078458	884151	7077783	884157	7078547	890353	7078377	890304

Tabla 3. Media posterior del umbral de tolerancia (T_o), respuesta en porcentajes (b en %/udT) de grasa y proteína a incrementos en temperatura media (T_{media}) y máxima (T_{max}) e índice THI y criterio de bondad de ajuste del modelo (DIC), en la población total y en animales de alta producción (AP) de raza Florida. Los intervalos de máxima densidad 95% se muestran en corchetes.

% Grasa	T_{media}		T_{max}		THI	
	Total	AP	Total	AP	Total	AP
T_o	6.2 [5.7 6.8]	12.5 [11.2 13.4]	17.2 [17.0 17.4]	17.4 [16.8 18.3]	20.0 [16.8 17.1]	17.6 [17.0 18.5]
b	-0.06 [-0.06 -0.05]	-0.07 [-0.08 -0.06]	-0.08 [-0.09 -0.08]	-0.06 [-0.06 -0.05]	-0.05 [-0.06 -0.05]	-0.09 [-0.10 -0.08]
DIC	139277	20348	139454	20339	139613	20363
% Proteína	T_{media}		T_{max}		THI	
	Total	AP	Total	AP	Total	AP
T_o	6.5 [6.1 7.0]	9.2 [8.3 10.3]	13.9 [13.6 14.3]	15.8 [14.4 17.2]	14.7 [14.3 15.2]	16.9 [16.0 17.7]
b	-0.03 [-0.03 -0.02]	-0.03 [-0.03 -0.02]	-0.02 [-0.022 -0.021]	-0.02 [-0.024 -0.021]	-0.03 [-0.034 -0.032]	-0.04 [-0.037 -0.033]
DIC	37088	5280	37381	5313	37412	5325

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Finocchiaro. R., van Kaam. J.B.C.H.M., Portolano. B. & Misztal. I. 2005. J. Dairy Sci. 88:1855-1864. Menendez-Buxadera. A., Molina. A., Arrebola. F., Clemente. I. & Serradilla. J.M. 2012a. J. Anim. Breed. Genet. 129:306-315. Menendez-Buxadera. A., Castro. J.A., Medina. C., Osorio. J., Torres. R., Serradilla. J.M. & Molina. A. 2012b. MG-FEAGAS 37:131-141. Misztal. I. 1999. J. Dairy Sci. 82(Suppl1):32(Abstr.). Romero. F., Molina. A., González. O., Clemente. I., Arrebola. F. & Menéndez-Buxadera. A. 2008. ITEA 104:243-248.

Agradecimientos: Este estudio fue financiado por el proyecto RTA2011-00108. Los autores agradecen a la AEMET el aporte de los datos meteorológicos, al Dr. Juan Pablo Sanchez la cesión del programa informático para la estimación de umbrales y pendientes de ET y a las asociaciones de ganado ovino Manchego y caprino Florida el aporte de datos productivos.

HEAT STRESS IN TWO LOCAL BREEDS OF DAIRY RUMINANTS

ABSTRACT: Fat and protein production from 191.768 ewes and 11.259 goats, together with climatic variables were used to determine the threshold and response to heat stress (HS) in dairy sheep (Manchega) and goat (Florida) Spanish local populations. Models including the effects of herd-year of test day, number and stage of lactation, age of the animal at recording, prolificacy, milking time, animal and a regression (b) on the climatic variable that operates only after a certain threshold (T_o) were used. Average (T_{ave}) and maximum temperature (T_{max}) plus an index combining both temperature and humidity (THI) were used as climatic variables. The analyses were carried out for the whole population and for the highly producing (AP) animals (1.5 sd above average). T_o was lower for goats than for sheep around 10°C vs. 29 °C for T_{media} and T_{max} , respectively. Small b values were observed for the whole sheep population, but a larger impact of HS was found for the AP animals. For these, b ranged between 6 (fat) and 16 (protein)g/°C. For the goat population, declines were similar for the global and AP data, but larger for fat%, ranging between 0.05 and 0.09% per unit of climatic variable.

Keywords: heat stress. small ruminants. dairy production.

RELACIÓN ENTRE VIDA PRODUCTIVA Y EDAD AL PRIMER PARTO EN OVEJAS DE LECHE Y CARNE

Jurado¹, JJ., Jiménez, MA.

¹ Dpto. de Mejora Genética Animal. Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. de la Coruña Km 7,00. 28040 MADRID.
E-mail: jurado@inia.es

INTRODUCCIÓN

La extensión de la vida productiva de las ovejas es, sin duda, un factor económico de primer orden para rentabilizar las explotaciones ovinas tanto en razas de carne como de leche. Existe controversia acerca del momento idóneo en que las ovejas han de tener su primer parto para que su vida incluya el mayor número de partos posibles antes de su baja. Un parto temprano da lugar a un mayor lapso de tiempo para tener los partos pero el animal puede no estar fisiológicamente maduro y ser dado de baja prematuramente. Un parto tardío dará a las ovejas una madurez adecuada, pero el número de partos posibles antes de su baja será menor. En los programas de mejora genética la edad al primer parto influye en el intervalo generacional y como consecuencia en el progreso genético anual.

La extensión de la vida productiva está determinada por el periodo de tiempo transcurrido entre el primer parto de la oveja y el momento en que el ganadero decide su baja. La importancia económica de este carácter hace pensar en la conveniencia de tenerlo en cuenta entre los criterios de selección de los reproductores. Para ello es necesario fijar el principio y fin de su permanencia en el rebaño, así como su variabilidad genética.

El propósito de este artículo es establecer el mejor momento para iniciar la vida productiva de un animal, de modo que dé lugar al mayor número de partos posibles, y estimar sus parámetros genéticos con el objetivo de ser incluido como criterio de selección en los programas de mejora genética. Respecto a este último punto cabe añadir que aunque la vida productiva se conoce solo una vez que el animal ha sido dado de baja, limitando de este modo la utilidad del carácter, cabe hacer una estima previa en función de la parte conocida y de la relación de parentesco que existe con otros animales que tienen información completa (Jurado y Gonzalez-Recio, 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

En este artículo la **vida productiva** se mide como el número de partos acumulados desde el primer hasta el último parto registrado en la base de datos. Se exige tener siempre al menos dos partos. La razón es que si una oveja tiene un segundo parto es porque el ganadero considera que el animal es apto para seguir en el rebaño. Se establece como último parto el anterior a su fecha de baja. En la mayor parte de los casos, la fecha de baja es desconocida, considerando que una oveja ha causado baja si no ha tenido partos en dos años consecutivos. Esto implica asumir que desde el segundo al último parto no existen bajas por causa involuntaria ya que se carece de información adicional para discriminar entre desecho voluntario e involuntario.

Se han utilizado las bases de datos de las razas Assaf (leche) y Rasa Aragonesa (carne). Se han elegido ovejas que no han parido en los dos últimos años después del último parto registrado y que tienen al menos dos partos. En el caso de la raza Rasa Aragonesa son 21.630 ovejas y en el caso de la raza Assaf 28.202 ovejas.

Para la determinación de la relación entre el primer parto y la vida productiva se han empleado modelos en los que se han incluido varias categorías de efectos fijos:

- a) Efectos relacionados con la precocidad de la vida productiva (días comprendidos entre el nacimiento y el primer parto). Se han establecido diversos niveles: Menos de 15 meses, de 15 a 20 meses, de 20 a 24 meses y más de 24 meses.
- b) Efectos relacionados con el ritmo de partos (intervalo medio de días entre partos sucesivos).
- c) Efectos relacionados con la intensidad de la producción. En el caso de la raza Assaf, para cada oveja, se ha utilizado la producción media de leche tipificada a 150 días, y

el número medio de corderos por parto. En la raza Rasa-Aragonesa solo se ha incluido el número medio de corderos nacidos por parto.

- d) Efectos relacionados con el manejo de la explotación (rebaño) y el momento de la presencia de la oveja en el programa de mejora (año de primer parto).

Los modelos utilizados en el estudio han sido los siguientes:

$$\begin{array}{ll} \text{Rasa- Aragonesa (carne)} & np = \mu + gan + nc + e1p + ip + a1p + \varepsilon \\ \text{Assaf (leche)} & np = \mu + gan + nc + L150 + e1p + a1p + \varepsilon \end{array}$$

donde **np** es el número total de partos registrados de la oveja (vida productiva), **μ** es la media de la población, **gan** es el rebaño, **nc** es el número medio de corderos nacidos por parto, **e1p** es la edad al primer parto (codificado), **ip** es el intervalo medio entre partos, **L150** en la producción media de leche tipificada a 150 días (Kg), **a1p** es el año del primer parto, y **ε** es el residuo. Para estimar los efectos fijos del modelo se ha utilizado el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 2002). Para estimar la heredabilidad del carácter número total de partos se han utilizado los mismos modelos que en el estudio anterior, incluyendo además un factor aleatorio que representa el valor genético de la oveja. Se ha usado el programa VCE 6.0.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en los análisis SAS y VCE de la raza Rasa-Aragonesa. Todos los efectos fijos han sido significativos, y los distintos niveles de edad al primer parto resultaron diferentes entre sí. Las medias de la edad al primer parto (valores LSMEANS) indican que las ovejas que paren con menos de 15 meses obtienen una media de 6 partos antes de su baja. Por el contrario, retrasar el primer parto hasta edades superiores a los 24 meses hace que el número de partos total sea de solo 4,76 partos (1,19 partos menos que en el primer caso). La heredabilidad estimada para el carácter vida productiva (número total de partos) es significativa pero baja (0,05).

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la raza Assaf. Al igual que en el caso anterior, todos los efectos considerados en el modelo han sido significativos. Sin embargo, los niveles establecidos para la edad al primer parto no han resultado diferentes entre sí (solo existen diferencias significativas entre el nivel 1 y el resto de los niveles). Las medias mínimo cuadradas indican que adelantar el primer parto antes de los 15 meses supone una pequeña ventaja con relación a otras edades (4,89 partos frente a los 4.72-4,73 partos correspondientes a edades superiores a los 15 meses), pero tener el primer parto entre los 15 y los 24 meses no supone ninguna diferencia significativa y por ello, ventaja alguna. En esta raza, la heredabilidad estimada para el carácter número total de partos, es moderadamente heredable (0,10).

Las conclusiones que se pueden extraer de los resultados son las siguientes:

1. La vida productiva media en la raza Rasa-Aragonesa (5,52 partos) es superior a la de la raza Assaf (3,61 partos).
2. En la raza Rasa-Aragonesa adelantar el primer parto supone una mayor duración de la vida productiva.
3. En la raza Assaf adelantar los partos supone una pequeña ventaja, que es inexistente para edades al primer parto superiores a 15 meses.
4. En la raza Rasa-Aragonesa la heredabilidad es baja. Esto cuestionaría la selección genética para este carácter.
5. En la Raza Assaf el valor de la heredabilidad permitiría incluir este carácter en un índice de selección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Jurado, J.J., González, O. 2010. XV Reunión Nacional de Mejora Genética Animal. Vigo (España). ●Groeneveld, E., Kovac, M., Mielenz, N. 2008. VCE User's Guide and Reference Manual version 6.0.2. ●Neumaier, A., Groeneveld, E. 1998. Genet. Sel. Evol. 30, 3-26. SAS 9.1 (2002). SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

Tabla 1.- Resultados de los análisis SAS y VCE de la raza RASA-ARAGONESA

	N	μ	R ²	C.V.
np	21.630	5,52	0,50	36,89

e1p	np (LSMEANS)	Stderr
< 15 meses	5,95 a	0,1389
> 15 y > 20	5,53 b	0,1372
> 20 y > 24	5,37 c	0,1384
> 24 meses	4,76 d	0,1372

	Var(u)	Var(e)	h ²
np	0,19 (0,069)	3,94 (0,078)	0,046 (0,017)

Tabla 2.- Resultados de los análisis SAS y VCE de la raza ASSAF

	N	μ	R ²	C.V.
np	28.202	3,61	0,33	38,19

e1p	np (LSMEANS)	Stderr
< 15 meses	4,89 a	0,0403
> 15 y > 20	4,74 b	0,0436
> 20 y > 24	4,74 b	0,0439
> 24 meses	4,72 b	0,0408

	Var(u)	Var(e)	h ²
np	0,19 (0,028)	1,70 (0,031)	0,101 (0,015)

N: Número de datos; **μ :** Media de la variable; **R²:** Coeficiente de determinación; **C.V.:** Coeficiente de variación; **e1p:** edad al primer parto (codificado); **np:** número total de partos registrados de la oveja (LSMEANS); **Stderr:** Error estándar. Letras diferentes en niveles del mismo factor indican diferencias significativas (P < 0,05). **Var(u), Var(e), h²:** componentes de varianza y heredabilidad.

RELATIONSHIP BETWEEN PRODUCTIVE LIFE AND AGE AT FIRST LAMBING IN MILK AND MEAT SHEEP.

ABSTRACT: Productive life and age at first lambing are factors affecting the profitability of sheep farms and the annual genetic selection programs. This research attempts to determine the best time to start the animal's productive life to achieve the greatest possible number of births, and estimate its genetic parameters in order to be included as a future selection criterion. An analysis of variance (GLM procedure of SAS) of productive life (number of births registered for an ewe) was performed using the age at first lambing, flock, average type of birth, average lambing interval and year of first birth as sources of variation in two breeds (21.630 data culled animals of Rasa and 28.202 of Assaf breed). The average productive life was higher in Rasa breed than in Assaf (5.52 vs 3.61). A significant increase in the number of lambings when the first one occurs before 15 months was found in both breeds. The estimated heritability has been significantly different from zero but moderate (0.05 in Rasa and 0.10 in Assaf).

Keywords: Assaf and Rasa-Aragonesa breeds, number of births, heritability

SELECCIÓN POR TASA DE OVULACIÓN Y TAMAÑO DE CAMADA EN CONEJO. ESTIMACIÓN DE LA RESPUESTA A LA SELECCIÓN

A.Y. Badawy¹, R. Peiró^{1,2}, M.L. Mocé^{1,3}, A. Blasco¹, M.A.Santacreu^{1,*}

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de Valencia.

² Dirección actual: Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Universitat Politècnica de Valencia.

³ Dirección actual: Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad CEU-Cardenal Herrera. msantacr@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

La selección por tasa de ovulación y capacidad uterina no ha mejorado la respuesta en tamaño de camada más que la selección directa en conejo (Laborda et al., 2012; Blasco et al., 2005; Bolet et al., 1994). Los mismos resultados se han obtenido en los experimentos de selección realizados en porcino por tasa de ovulación (Cunningham et al., 1979; Leymaster y Christenson, 2000; Rosendo et al., 2007), por supervivencia prenatal (Rosendo et al., 2007) y por un índice por tasa de ovulación y supervivencia prenatal (Johnson et al., 1999). Se ha obtenido, sin embargo, una respuesta apreciable en un experimento de selección por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada en porcino (Ruiz-Flores and Johnson, 2001). Actualmente, se está llevando a cabo un experimento de selección por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada en conejo. El objetivo de este trabajo es estimar la respuesta a la selección en esta línea después de nueve generaciones de selección en una línea previamente seleccionada por tasa de ovulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Los animales utilizados en este experimento se seleccionaron durante 6 generaciones por tasa de ovulación (primer periodo de selección) y posteriormente durante 9 generaciones por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada (segundo periodo de selección). La selección por tasa de ovulación se hizo en base a la tasa de ovulación en la segunda gestación; se aplicó una presión de selección del 30%. En la selección por niveles independientes, en la primera etapa se seleccionaron hijas de las hembras que presentaban una mayor tasa de ovulación en la segunda gestación y luego de entre esas hembras las que presentaban el mayor promedio de nacidos totales de los dos primeros partos; se aplicó una presión de selección total por generación de aproximadamente el 30% (65% y 50% para cada carácter, respectivamente). La selección de machos se hizo dentro de familia de macho para controlar la consanguinidad. Los animales se alojaron en la granja de la Universitat Politècnica de València con un fotoperiodo controlado de 16 h de luz: 8 h de oscuridad. Las hembras iniciaron su vida reproductiva a las 18-20 semanas de vida; la monta se realiza a los 12 días post-parto. Se han analizado un total de 4084 partos y 1841 tasas de ovulación de un total de 1194 hembras. La genealogía incluyó un total de 1467 animales.

Caracteres. Se ha analizado la tasa de ovulación (TO) en la segunda y última gestación y el tamaño de camada hasta un máximo de 7 partos. La TO se estimó como el número de cuerpos lúteos (contabilizados por laparoscopia el día 12 de la segunda gestación y post-mortem en la última gestación). El tamaño de camada al nacimiento (TC) se estimó como el número de nacidos totales.

Análisis estadísticos. El modelo utilizado para analizar la tasa de ovulación y el tamaño de camada es el siguiente:

$$y_{ijklm} = AE_i + P_j + L_k + a_{ijkl} + p_{ijkl} + e_{ijklm}$$

donde, AE_i es el efecto año-estación (43 y 44 niveles para TO y TC, respectivamente), P_j es orden del parto (4 y 5 niveles para TO y TC, respectivamente), L_k es el efecto de lactación (2 niveles), a_{ijkl} es el valor aditivo del animal, p_{ijkl} es el efecto permanente no aditivo de la hembra, y e_{ijklm} es el error del modelo.

Se realizó un análisis bayesiano bivalente con aumento de datos. Después de varios análisis exploratorios se utilizó una cadena de 3,000,000 iteraciones, con un periodo de quemado de 200,000 iteraciones, tomando una de cada 100. La posible falta de convergencia se realizó utilizando el criterio de Geweke. Todas las distribuciones a priori fueron planas, salvo el efecto aditivo de los animales y el efecto permanente. Se asumió que

los efectos aditivos y permanentes se distribúan normalmente, con media 0 y componentes de (co)varianza G y P. Los efectos permanentes están correlacionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores medios obtenidos para el TC y para la TO de todas las hembras analizadas en el experimento han sido de 9.1 gazapos y 16 óvulos. El valor del TC se encuentra dentro del rango de los valores publicados para líneas maternas por otros autores (García y Baselga 2002; Santacreu et al., 2005; Laborda et al., 2012). La TO es similar a la obtenida por Laborda et al. (2012) en un experimento de selección por TO y algo más elevada que la publicada por García y Baselga (2002) en una línea seleccionada por número de destetados y Santacreu et al. (2005) en una línea seleccionada por capacidad uterina, 15.0 y 14.8 óvulos respectivamente.

La heredabilidad estimada para TO presenta un valor medio que está en concordancia con las estimas publicadas por otros autores en conejo (Blasco et al., 1992; Blasco et al., 1993; Laborda et al., 2012). El valor garantizado de la heredabilidad es de 0.33 con una probabilidad del 80%. Para el TC, el valor de la heredabilidad fue de 0.10, valor que está dentro del rango de las estimas obtenidas en otros trabajos en conejo (Blasco et al., 1993; Blasco, 1996; Laborda et al., 2012). La correlación genética entre ambos caracteres es positiva siendo la probabilidad de obtener una correlación entre el TC y la TO mayor de cero del 100%. Además, la probabilidad de que la correlación sea al menos de 0.20 es del 95%.

Tabla 1. Resultados de las distribuciones marginales posteriores de la heredabilidad de la tasa de ovulación (h^2_{TO}) y el tamaño de camada (h^2_{TC}) y su correlación genética (rg_{TO-TC}).

	Media	Mediana	HPD _{95%}	k	MCse	Z
h^2_{TO}	0.22	0.22	0.14 , 0.29	0.15	0.001	-0.02
h^2_{TC}	0.10	0.09	0.05 , 0.15	0.05	0.001	-0.74
rg_{TO-TC}	0.49	0.49	0.15 , 0.85	0.33	0.001	1.84

SD: Desviación estándar; HPD_{95%}: Intervalo de máxima densidad al 95%; k: valor garantizado [k, ∞) conteniendo una probabilidad del 80%; MCse: error estándar de Monte Carlo; Z: Z-score del test de Geweke.

En la figura 1 se muestran las medias genéticas estimadas por generación para ambos caracteres. En el primer periodo, la selección por TO durante 6 generaciones ha incrementado la tasa de ovulación en aproximadamente 1.3 óvulos (0.22 óvulos por generación), sin embargo la respuesta correlacionada en TC ha sido menor, aproximadamente medio gazapo (0.1 gazapos por generación). Este pequeño aumento del tamaño de camada respecto al aumento de la tasa de ovulación se debe a un descenso de la supervivencia prenatal. La respuesta estimada para la TO es similar a la obtenida en la misma población por Laborda et al. (2012) después de 10 generaciones de selección por tasa de ovulación. En este experimento no se observó una respuesta correlacionada en tamaño de camada debido principalmente a un aumento de la mortalidad fetal. En el segundo periodo, la selección por niveles independientes para TO y TC durante 9 generaciones también ha incrementado la tasa de ovulación (1.50 óvulos), pero la respuesta ha sido menor (0.17 óvulos por generación) que en el primer periodo debido principalmente a la menor presión de selección ejercida en este carácter durante el segundo periodo. El aumento de 1.5 óvulos ha dado lugar a un incremento de 1.5 gazapos, lo que implica una mejora de la supervivencia prenatal. El aumento de tamaño de camada ha sido aproximadamente de 0.17 gazapos/generación. La respuesta estimada en los experimentos de selección directa por tamaño de camada en conejos es aproximadamente de 0.10 gazapos/generación (Mocé y Santacreu, 2010). Por tanto, la selección por niveles independientes por tasa de ovulación y tamaño de camada puede mejorar la respuesta obtenida en tamaño de camada por selección directa.

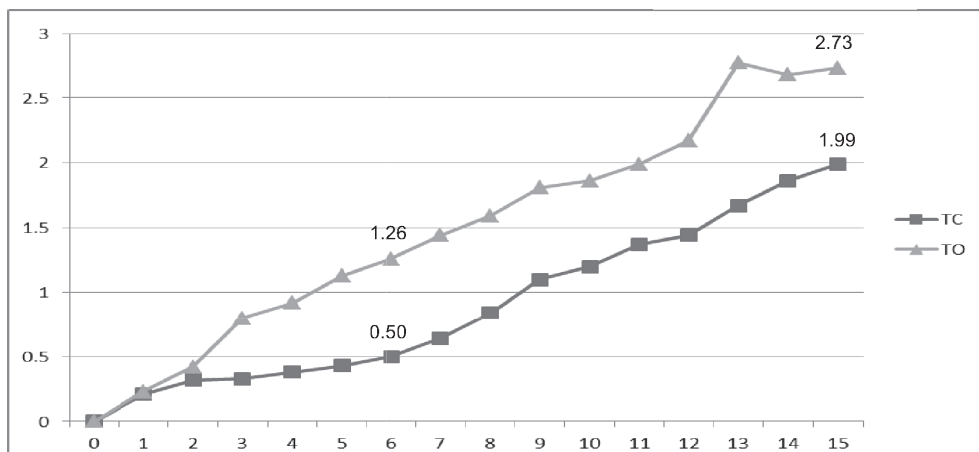


Figura 1. Media genética estimada por generación para tasa de ovulación (TO) y tamaño de camada (TC) en un experimento de selección por tasa de ovulación durante 6 generaciones de selección y por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada durante 9 generaciones de selección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Blasco, A. 1996. VI World Rabbit Congress 2: 219-227. • Blasco A., Ortega J. A., Climent A., Santacreu M. A. 2005. J. Anim. Sci. 83: 2297-2302. • Blasco A., Santacreu M.A., Thompson, R., Haley, C.S. 1992. Livest. Prod. 34: 163-174. • Bolet G., Santacreu M.A., Argente M.J., Climent A., Blasco A. 1994. Proc. 9th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. 19: 261-264. • Cunningham P.J., England M. E., Young L. D., Zimmerman D. R. 1979. J. Anim. Sci. 48: 509-516. • García M. L., Baselga M. 2002. Livest. Prod. Sci. 74: 45-53. • Johnson R.K., Nielsen M.K., Casey D. S. 1999. J. Anim. Sci. 77: 541-557. • Laborda P., Mocé M. L., Blasco A., Santacreu M. A. 2012. J. Anim. Sci. 90: 439-446. • Leymaster K.A., Christenson R. K. 2000. J. Anim. Sci. 78: 68. • Mocé, L., Santacreu M.A. 2010. CD- Proc. 9th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. • Rosendo A., Druet T., Gogué J., Bidanel J.P. 2007. J. Anim. Sci. 85: 356-364. • Ruiz-Flores A., Johnson R. K. 2001. J. Anim. Sci. 79: 2286-2299. • Santacreu M.A., Mocé M. L., Climent A., Blasco A. 2005. J. Anim. Sci. 83: 2303-2307.

Agradecimientos: Este experimento ha sido financiado con los proyectos CICYT-AGL2008-05514-C02-01 y CICYT-AGL2011-29831-C03-01.

RESPONSE TO SELECTION FOR OVULATION RATE AND LITTER SIZE IN RABBITS.

ABSTRACT: Two-stage selection for ovulation rate (OR) and litter size (LS) was performed during 9 generations using a rabbit line previously selected 6 generations by OR. In both periods, ovulation rate was estimated at d 12 of gestation by laparoscopy. Selection for litter size was based on the average litter size over the first two parities. Total selection pressure in females was about 30% in both periods. Data from 1194 females were analyzed using Bayesian methodology. The estimated heritabilities of OR and LS were 0.22 and 0.10, respectively. The genetic correlation between both traits was 0.49.

After 6 generations of selection for ovulation rate, this trait increased around 1.3 ova, but the correlated response on LS was low (0.5 kits). However, after 9 generations of selection by the two stage procedure, OR and LS increased around 1.5 ova and 1.5 kits, respectively.

Keywords: rabbit, two-stage selection, litter size, ovulation rate.

RESPUESTAS EN SELECCIÓN DIVERGENTE POR VARIANZA AMBIENTAL DEL TAMAÑO DE CAMADA EN CONEJO

Martínez-Álvaro M.^{1*}, Ibáñez-Escriche N.², Argente M.J.³, García M.L.³, Blasco A.¹.

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València. Apartado de correos 22012.46071 Valencia.

² Genètica i Millora Animal, Centre IRTA-Lleida, C/Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

³ Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra de Benial km3.2, 03312 Orihuela. *mamara19@etsia.upv.es

INTRODUCCIÓN

Varios estudios proponen que la varianza ambiental se encuentra bajo control genético (SanCristóbal-Gaudy *et al.*, 2001 en tamaño de camada en ovejas; Sorensen y Waagepetersen, 2003 en tamaño de camada en cerdos; Bolet *et al.*, 2008 en peso al nacimiento en conejos; Ibáñez-Escriche *et al.*, 2008 en capacidad uterina en conejos). Lamentablemente estos estudios se basan en modelos altamente parametrizados muy poco robustos en los que, por ejemplo, un leve alejamiento de la normalidad en los residuos puede dar lugar a resultados completamente diferentes (Yang *et al.*, 2011). La selección directa sobre este carácter permitiría resolver esta incógnita debido a que no depende (o depende mucho menos) de la modelización del carácter. El objetivo de este trabajo es estimar la respuesta a la selección del carácter varianza residual del tamaño de camada en un experimento de selección divergente por este carácter en conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se emplearon un total de 1591 hembras provenientes de un experimento de selección divergente por el carácter varianza residual del tamaño de camada (V_e). Los datos de tamaño de camada se precorrigen por los efectos de año-estación y estado de lactación. La varianza fue calculada mediante el estimador de mínimo riesgo cuadrático:

$$\frac{1}{(n+1)} \sum_{i=1}^{i=n} (x - \bar{x})^2$$

donde n es el número de partos por hembra (n varía desde 2 hasta 12 partos). Los animales fueron criados en la granja de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Cada línea consta de 125 hembras y 25 machos por generación aproximadamente. La media de partos por coneja fue de 4.6. La presión de selección media sobre las hembras fue de un 30% por línea. Los machos fueron elegidos dentro de familias de padre, para evitar un incremento de la consanguinidad. Los caracteres analizados fueron: varianza residual (V_e), varianza residual de los datos sin precorregir (V_r) y tamaño de camada (TC). La distribución de V_e fue: $\mathbf{V_e} | \mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_e^2 \sim N(\boldsymbol{\mu} + \mathbf{Zu}, \mathbf{K}\sigma_e^2)$, donde $\boldsymbol{\mu}$ es un vector que incluye únicamente la media del carácter y \mathbf{u} es el vector que incluye el efecto aditivo de las hembras ($\mathbf{u} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_u^2)$) donde \mathbf{A} es la matriz de parentesco. Se analizó V_r con el mismo modelo. Como las varianzas residuales no están calculadas con el mismo número de partos, se ha considerado que los residuos del modelo se distribuyen normalmente con media 0 y varianza $\mathbf{K}\sigma_e^2$, donde \mathbf{K} es una matriz diagonal de ponderaciones con el siguiente elemento en la diagonal:

$$\frac{2(n-1)}{(n+1)^2}$$

siendo n el número de partos con el que se ha calculado la varianza de cada hembra. Este peso viene de obtener la varianza de un estimador cuadrático de mínimo riesgo. Para la estima de las heredabilidades no se consideró la ponderación anterior. Los datos de TC se distribuyeron: $\mathbf{TC} | \mathbf{b}, \mathbf{u}, \mathbf{p}, \sigma_e^2 \sim N(\mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \mathbf{Wp}, I\sigma_e^2)$. El vector \mathbf{b} incluye los efectos ambientales de generación y estado de lactación y \mathbf{p} son los efectos permanentes ($\mathbf{p} \sim N(\mathbf{0}, I\sigma_p^2)$). Todos los análisis se han llevado a cabo mediante metodología bayesiana. Se utilizaron priors planos acotados para todos los efectos y varianzas. Las distribuciones marginales posteriores se estimaron por muestreo de Gibbs. La convergencia fue testada usando el criterio Z de Geweke y los errores de Monte Carlo fueron obtenidos por series temporales (Sorensen y Gianola, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las respuestas obtenidas por generación y línea. El test de Geweke no detectó falta de convergencia y el error de Monte Carlo fue pequeño en todas las variables.

Hubo respuesta en todas las generaciones de selección. Esto confirma la existencia de genes involucrados en la V_e , probablemente relacionados con la sensibilidad de las conejas al estrés y a las enfermedades. La respuesta para las líneas alta y baja fue asimétrica. En la Figura 2 se muestran los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las respuestas en el carácter V_r obtenidas por generación y línea. Las respuestas obtenidas para los caracteres V_e y V_r son similares; por tanto, el efecto de la precorrección de los datos parece no afectar a los resultados.

En la Figura 3 se muestran los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las respuestas en el carácter TC obtenidas por generación y línea. El TC se ha incrementado al seleccionar por baja varianza residual, y aunque de manera más irregular, ha disminuido en la línea alta, mostrando una correlación negativa entre TC y V_e . Ibáñez-Escriche *et al.*, 2008 estimaron una correlación negativa entre capacidad uterina y varianza residual en conejos, pero Yang *et al.*, 2011, haciendo una transformación Box-Cox para normalizar residuos, observaron que cambiaba de signo. Estos últimos resultados se discuten como artefactos del modelo, que es muy poco robusto.

En la Tabla 1 se muestran las características de las distribuciones marginales posteriores de la heredabilidad de los caracteres analizados. Las heredabilidades estimadas para los caracteres V_e y V_r son bajas. Otros autores, usando el modelo propuesto por SanCristóbal-Gaudy *et al.*, 2001 encuentran también estimas de heredabilidad bajas para V_e (Garreau *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2006). Las respuestas obtenidas en el experimento parecen ser atribuibles a la alta variabilidad de los caracteres. La heredabilidad obtenida para el carácter TC se asemeja a los valores de heredabilidad de tamaño de camada en conejos que se encuentran en la bibliografía.

CONCLUSIÓN

La respuesta obtenida tras seleccionar directamente por el carácter V_e confirma la existencia de genes controlando dicho carácter.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bolet G., Garreau H., Hurtard J., Saleil G., Esparbié J., Falieres J., Theau-Clément M., Bodin L., 2008. 9th WRC- Verona (Italia). • Garreau H., SanCristóbal M., Hurtard J., Bodin L., Ros M., Robertgranie C., Saleil G., Bolet G., 2004. 8th WRC-Puebla (Méjico). • Gutiérrez, J. P., Nieto B., Piqueras P., Ibáñez N., Salgado C., 2006. *Genet. Sel. Evol.*, 30:445-462. • Ibáñez-Escriche N., Sorensen D., Blasco, A., 2008 9th WRC- Verona (Italia). • SanCristóbal-Gaudy M., Bodin L., Elsen J.M., Chevalet C., 2001. *Genet. Sel. Evol.* 33:249-271. • Sorensen D., Gianola D., 2002. Springer, Nueva York, USA. • Sorensen, D., Waagepetersen, R., 2003. *Genet. Res. Camb* 82:207-222. • Yang Y., Christensen O., Sorensen D., 2011. *Gen. Res. Camb.*, 93:125-138.

RESPONSES OF DIVERGENT SELECTION FOR ENVIRONMENTAL VARIABILITY IN THE LITTER SIZE IN RABBIT.

ABSTRACT: A divergent selection experiment for residual variance of litter size was carried out in rabbits. The selection criterion was the residual variance of litter size, after correcting litter size for the effects of generation and lactation status (V_e). Bayesian methods were used to analyze the response obtained in the first five generations. The results showed a response in V_e . A negative correlated response was observed in litter size.

Keywords: Residual variances, rabbits, litter size.

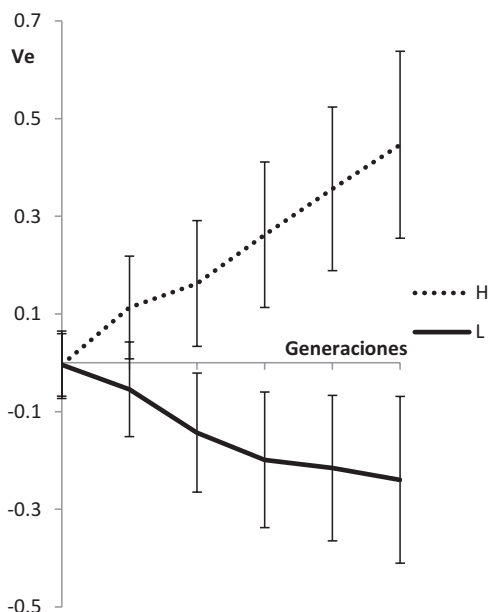


Figura 1. Medias y desviaciones típicas de las distribuciones marginales posteriores de las respuestas obtenidas en cada línea y generación para el carácter varianza residual de datos de tamaño de camada precorregido por los efectos año-estación y estado de lactación (Ve). H: línea alta. L: línea baja.

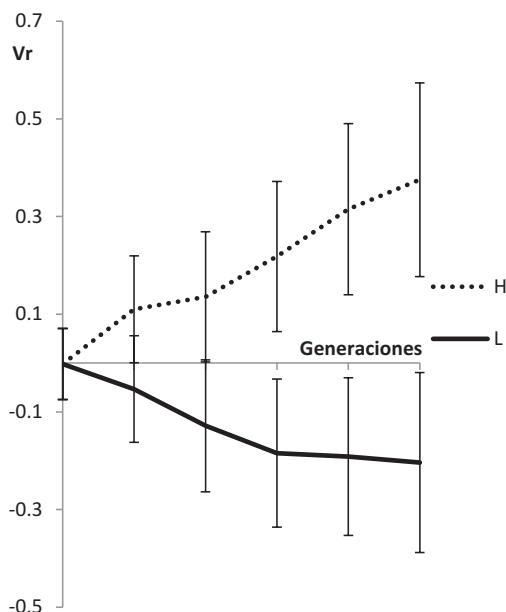


Figura 2. Medias y desviaciones típicas de las distribuciones marginales posteriores de las respuestas obtenidas en cada línea y generación para el carácter varianza residual de datos de tamaño de camada sin precorregir (Vr). H: línea alta. L: línea baja.

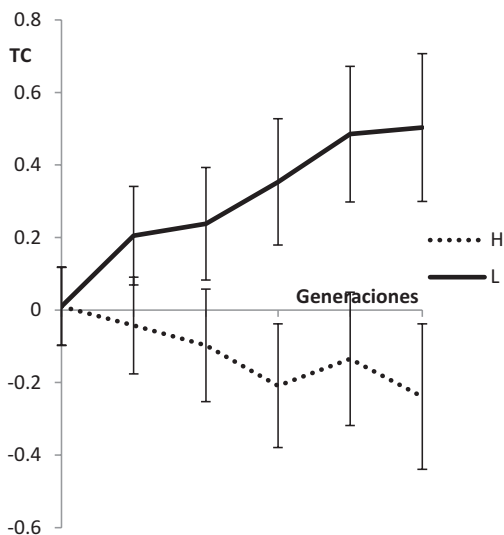


Figura 3. Medias y desviaciones típicas de las distribuciones marginales posteriores de las respuestas obtenidas en cada línea y generación para el carácter tamaño de camada (TC). H: línea alta. L: línea baja.

Tabla 1. Heredabilidades para los caracteres Ve, Vr y TC.

	M	HPD(95%)
Ve	0.06	[0.01,0.11]
Vr	0.05	[0.01,0.10]
TC	0.12	[0.08,0.17]

Ve: varianza residual de datos de tamaño de camada precorregidos por los efectos año-estación y estado de lactación. Vr: varianza residual de datos de tamaño de camada sin precorregir. TC: tamaño de camada. M: mediana de la distribución posterior. HPD (95%): región de alta densidad posterior al 95%.

EFFECTO DE LA SELECCIÓN POR VARIANZA RESIDUAL DEL TAMAÑO DE CAMADA SOBRE LOS COMPONENTES DEL TAMAÑO DE CAMADA Y EL PESO DEL GAZAPO AL NACIMIENTO

Sánchez, D.¹, Esclapez, A.¹, Argente, M.J.^{1*}, García, M.L.¹, Muelas, R.¹, 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. Universitat Politècnica de València, P.O. Box 22012. 46071 Valencia, Spain. *mj.argente@umh.es

INTRODUCCIÓN

El tamaño de camada es un carácter de considerable interés económico tanto en porcino como en conejo, pero difícil de seleccionar debido a su baja heredabilidad. Los trabajos de SanCristobal-Gaudy et al. (2001) en ovejas, Sorensen y Waagepetersen (2003) en cerdos y Gutiérrez et al. (2006) en ratones sugieren que la varianza residual del tamaño de camada puede estar bajo control genético. Una reducción de la varianza residual del tamaño de camada aumentaría su heredabilidad, y como consecuencia su respuesta a la selección. Por otro lado, el ganadero prefiere hembras con camada más uniformes que faciliten su trabajo disminuyendo el número de adopciones, e incrementen la viabilidad de la camada. Finalmente, hay escasas evidencias en cualquier especie de que la varianza residual esté efectivamente controlada genéticamente, debido a que los modelos que consideran que la varianza ambiental está bajo control genético están fuertemente parametrizados. Por ello, se inicia un experimento de selección divergente directamente por varianza residual del tamaño de camada (V_e) en conejo en la Universidad Miguel Hernández de Elche (Argente et al., 2009). Tras cinco generaciones de selección, Blasco et al. (2012) encuentran una diferencia entre la línea de alta (H) y de baja (L) varianza residual en tamaño de camada de 1.21 para V_e y una respuesta correlacionada negativamente de -0.63 para el número total de gazapos al parto. El objetivo de este trabajo es analizar si la selección por varianza residual del tamaño de camada muestra una respuesta correlacionada sobre los componentes del tamaño de camada, tasa de ovulación, supervivencia embrionaria y fetal, así como con el peso del gazapo al nacimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Las conejas utilizadas en este estudio pertenecieron a la sexta generación del experimento de selección divergente por varianza residual del tamaño de camada (más detalles en Blasco et al., 2012). Se realizó una laparoscopia a los 12 días de la segunda gestación para estimar la tasa de ovulación y el número de embriones implantados. Se pesaron todos los gazapos al nacer en el primer y segundo parto.

Caracteres: Los caracteres analizados fueron la varianza residual del tamaño de camada (V_e), estimada como la varianza fenotípica del tamaño de camada dentro de hembra después de corregirlo por los efectos de año-estación y el estado de lactación (ver fórmula 1), el tamaño de camada (TC), la tasa de ovulación (TO), el número de embriones implantados (EI) a los 12 días de la segunda gestación, el número de fetos que llegaron al segundo parto (FP), el peso promedio al nacimiento dentro de camada de los gazapos vivos al parto (PPV) y la desviación dentro de camada del peso al nacimiento de los gazapos vivos (STD_{PV}).

$$\frac{1}{n_i + 1} \sum_{j=1}^{n_i} (e_{ij} - \bar{e})^2 \quad (1)$$

donde e_j es el tamaño de camada j de la hembra i después de corregirlo por el año-estación y estado de lactación, y n_i es el número de partos de cada hembra i .

Análisis estadísticos: Todos los análisis se realizaron utilizando metodología bayesiana. La variable V_e fue analizada con un modelo que sólo tenía como efecto la línea (con dos niveles: línea de alta (H) y baja (L) varianza residual en tamaño de camada de la sexta generación de selección). El modelo utilizado para analizar el TC incluyó los efectos de línea, estado de lactación, año-estación y el efecto aleatorio de hembra. La TO, EI, FP, PPV y STD_{PV} se analizaron con el mismo modelo utilizado para el TC pero sin el efecto aleatorio de hembra. El modelo para EI y FP incluyó además la covariable TO y EI, respectivamente. Se utilizaron priors planos acotados para todos los efectos sistémicos, con la excepción del

efecto de hembra, el cual se consideró que se distribuía de forma normal con media $\mathbf{0}$ y varianza $\mathbf{I}\sigma_d^2$, donde \mathbf{I} es la matriz identidad y σ_d^2 es la varianza de hembra. Los residuos se distribuyeron normalmente con media $\mathbf{0}$ y varianza $\mathbf{I}\sigma_e^2$. Los priors de las varianzas fueron también planos acotados. Las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre líneas se estimaron usando muestreo de Gibbs. Se tomaron cadenas 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 testada usando el criterio Z de Geweke y los errores de Monte Carlo fueron obtenidos por series temporales (Sorensen y Gianola, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran las medias para las variables Ve, TC, TO, EI, FP, PPV y STD_{PV} en la línea de alta (H) y de baja (L) varianza residual en tamaño de camada de la sexta generación de selección. La tabla 2 muestra los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre ambas líneas para Ve, TC, TO, EI corregido por TO, FP corregido por EI, PPV y STD_{PV} . El test de Geweke no detectó falta de convergencia y el error de Monte Carlo fue pequeño en todas las variables.

Después de seis generaciones de selección, las líneas H y L mostraron una diferencia de 1.17 gazapos² para el criterio de selección (Ve), con una probabilidad de ser positiva esta diferencia del 99%. Parece haber respuesta correlacionada en tamaño de camada, de forma que la línea seleccionada para incrementar la varianza residual del tamaño de camada (H) presenta un menor tamaño de camada ($D = -0.46$ gazapos, $P(D < 0) = 98\%$) que la línea L. Este resultado estaría de acuerdo con la correlación negativa encontrada entre ambos caracteres por Ibáñez-Escriche et al. (2008) en conejos y Sorensen y Waagepetersen (2003) en cerdos, aunque estas correlaciones están siendo cuestionadas recientemente puesto que están muy influidas por la falta de robustez de los modelos usados para estimarlas (Yang et al., 2011). El menor tamaño de camada encontrado en la línea H, parece estar relacionado tanto con una menor supervivencia embrionaria (-0.53 embriones, $P(D < 0) = 94\%$) como con una menor supervivencia fetal (-0.32 fetos, $P(D < 0) = 86\%$). Se podrán avanzar hipótesis más concluyentes al respecto, cuando se recojan más generaciones de selección.

Por otro lado, en especies multipáras como el conejo y el porcino, un aumento del tamaño de camada va acompañado de una disminución del peso al nacimiento y de un incremento de la variabilidad de este carácter dentro de la camada (Argente et al., 1999; Damgaard et al., 2003). En conejo, se ha observado una relación negativa entre la variabilidad del peso al nacimiento con la supervivencia del gazapo en la lactación, de forma que dentro de una camada los gazapos menos pesados no pueden competir con los más fuertes y mueren antes del destete (Argente et al., 1999). En este sentido, observamos que aunque las líneas H y L difieren en tamaño de camada al nacimiento en -0.46 gazapos, esta diferencia no afecta al peso del gazapo al nacimiento, pero la variabilidad dentro de camada para el peso del gazapo al nacimiento sí es afectada, de forma que la línea H muestra un menor valor para este carácter ($D = -0.40$, $P(D < 0) = 92\%$) que la línea L. En próximos trabajos, se analizará si esta diferencia en STD_{PV} va acompañada de una diferencia en la supervivencia del gazapo al destete.

CONCLUSIÓN

La selección por varianza residual del tamaño de camada muestra una respuesta correlacionada negativa sobre el tamaño de camada, a través de una menor supervivencia embrionaria y fetal, y sobre la variabilidad del peso al nacimiento dentro de la camada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argente M.J. Santacreu M.A. Climent A & Blasco A. 1999. *Livest. Prod. Scie.* 57: 159-167. • Blasco A. Garcia M. L. Muelas R. & Argente M. J. 2012. XVI Reunión Nacional de Mejora Genética Animal. • Damgaard L. H. Rydhmer L. Lovendahl P. & Grandinson K. 2003. *J. Anim. Scie.* 81: 605-610. • Gutiérrez J.P. Nieto B. Piñeras P. Ibáñez N. & Salgado C. 2006. *Genet. Sel. Evol.* 38:445-462. • Ibáñez-Escriche N. Argente M.J. Garcia M.L. Muelas R. Santacreu M.A. & Blasco A. 2008. 9th World Rabbit Congress, Vol 1:121-124. • SanCristobal-Gaudy M. Bodin L. Elsen J.M. & Chevalet C. 2001. *Evolution.* 33:249-271. • Sorensen D. & Gianola, D. 2002. Springer, New York. USA. • Sorensen D. & Waagepetersen R. 2003. *Genet. Res.* 82: 202-222. • Yang Y. Christensen O. F. & Sorensen D. 2011. *Genet. Res.* 93:33-46.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado con el proyecto AGL2008-05514-C02-02 y AGL2011-29831-C03-02.

Tabla 1. Media y desviación estándar (DS).

	Línea H			Línea L		
	n	Media	DS	n	Media	DS
Ve	143	5.04	4.13	119	3.87	4.01
TC	610	7.66	3.17	488	8.04	2.83
TO	120	13.33	2.48	107	13.16	2.08
EI	120	10.35	3.45	107	10.78	2.89
FP	120	7.18	3.54	107	7.75	2.99
PPV	247	56.42	11.70	202	56.30	12.47
STD _{PV}	247	5.55	2.97	202	5.96	2.98

n: número de datos. Ve: varianza residual del tamaño de camada dentro de hembra. TC: tamaño de camada. TO: tasa de ovulación. EI: número de embriones implantados a los 12 días de la segunda gestación. FP: número de fetos al segundo parto. PPV: el peso promedio al nacimiento dentro de camada de los gazapos vivos al parto. STD_{PV}: desviación del peso al nacimiento dentro de camada de los gazapos vivos. H: línea de alta varianza residual en TC. L: línea de baja varianza residual en TC.

Tabla 2. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre la línea de alta (H) y de baja (L) varianza residual en tamaño de camada.

	D	HPD _{95%}	P(%)
Ve	1.17	0.18, 2.22	99
TC	-0.46	-0.92, -0.01	98
TO	0.09	-0.51, 0.69	39
EI _{TO}	-0.53	-1.22, 0.17	94
FP _{EI}	-0.32	-1.07, 0.31	86
PPV	0.43	-1.77, 2.72	34
STD _{PV}	-0.40	-0.97, 0.19	92

Ve: varianza residual del tamaño de camada dentro de hembra. TC: tamaño de camada. TO: tasa de ovulación. EI_{TO}: número de embriones implantados corregido por la covariable tasa de ovulación. FP_{EI}: número de fetos al parto corregido por la covariable número de embriones implantados. PPV: el peso promedio al nacimiento dentro de camada de los gazapos vivos al parto. STD_{PV}: desviación del peso al nacimiento dentro de camada de los gazapos vivos. D: media posterior de la diferencia entre las líneas H y L. HPD_{95%}: región de alta densidad posterior al 95%. P: P(D>0) cuando D>0 y P(D<0) cuando D<0.

EFFECT OF SELECTION FOR RESIDUAL VARIANCE OF LITTER SIZE ON COMPONENTS OF LITTER SIZE AND BIRTH WEIGHT KIT

ABSTRACT: A divergent selection experiment on residual variance of litter size (Ve) was carried out in rabbits at University Miguel Hernández de Elche (UMH). After six generations of selection, the High line (H) showed a higher Ve than the Low line (L) (D=1.17 kits², P(D>0) = 99%). Selection for increasing Ve seems to decrease litter size in the H line (D=-0.46 kits, P(D<0) = 98%). This difference in litter size was related to lower embryonic (-0.53 embryos, P(D<0) = 94%) and fetal survival (-0.32 fetus, P(D<0) = 86%) in the H line. No difference was found in birth weight kits between lines. However, the H line showed a lower within-litter standard deviation of birth weight than the L line (D= -0.40, P(D<0) = 92%). In conclusion, selection for Ve has shown a negative correlated response in litter size, by means of lower embryonic and fetal survival, and lower within-litter standard deviation of birth weight.

Keywords: Residual variance, embryonic and fetal survival, birth weight, rabbits

SELECCIÓN DIVERGENTE POR GRASA INTRAMUSCULAR EN CONEJO. RESPUESTA DIRECTA A LA SELECCIÓN.

Zomeño, C., Hernández, P. y Blasco, A.
Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València.
*ablasco@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

El contenido de grasa intramuscular (IMF) juega un papel determinante en la calidad de la carne, afectando principalmente a la calidad organoléptica y a la calidad nutricional de la carne (Wood et al., 2008).

Hay pocos estudios que traten de modificar el contenido de IMF por selección (Sapp et al., 2002; Suzuki et al. 2005a; Schwab et al., 2009), y ninguno de ellos se ha llevado a cabo en conejo. No se dispone de estimas de heredabilidad de IMF en conejo pero la mayoría de estudios publicados en cerdo (Sellier, 1998; Suzuki et al., 2005b) y en vacuno (Bertrand et al., 2001) presentan estimas moderadas-altas. Los experimentos de selección divergente por IMF permiten conocer el determinismo genético del carácter de interés y generar dos poblaciones separadas sobre las que estudiar mejor los mecanismos genéticos que conducen a la deposición de la IMF.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la respuesta a la selección en IMF del músculo *Longissimus* tras tres generaciones de selección divergente. La heredabilidad y las tendencias genéticas también han sido estudiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron datos de tres generaciones de selección divergente por IMF. La población base estaba formada por 13 machos y 83 hembras. Las líneas alta (H) y baja (L) tenían aproximadamente 8 machos y 40 hembras por generación. La selección se realizó en el segundo parto de las hembras y se basó en el valor fenotípico de IMF medido en dos hermanos completos de primer parto. La presión de selección en las hembras fue de un 26% en la 1ª generación y un 13% en la 2ª y 3ª generación. Se utilizaron 668 conejos para estimar la respuesta a la selección. El pedigree utilizado para estimar la heredabilidad y las tendencias genéticas tenía 1332 datos.

Las líneas H y L fueron criadas de forma contemporánea. Dos conejos (un macho y una hembra) de primer parto de cada hembra fueron sacrificados a las 9 semanas de edad. A las 24 horas post mortem se separaron los músculos *Longissimus* (LM) de la canal, se picaron, liofilizaron y analizaron en un equipo NIRS (model 5000, FOSS NIRSystems INC.). El contenido de IMF se determinó a partir de las ecuaciones desarrolladas previamente (Zomeño et al., 2012) y se expresó en g/100g músculo fresco.

La respuesta a la selección se estimó por la comparación de las líneas H y L en la misma generación de selección aplicando el siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = LG_i + S_j + PO_k + p_{ikl} + e_{ijkl}$$

LG_i es el efecto de línea-generación (7 niveles: población base, línea H-1ª generación, línea L-1ª generación, línea H-2ª generación, línea L-2ª generación, línea H-3ª generación, línea L-3ª generación), S_j el efecto de sexo, PO_k el efecto orden de parto (3 niveles), p_{ikl} es el efecto de camada común (334 camadas) y e_{ijkl} es el residuo del modelo.

Se realizó un análisis bayesiano con el programa Rabbit (desarrollado por el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal) estimando las distribuciones posteriores por Gibbs sampling.

Para estimar la heredabilidad y las tendencias genéticas se utilizó el siguiente modelo:

$$y_{ijklm} = G_i + S_j + PO_k + c_{ikl} + a_{ijklm} + e_{ijklm}$$

G_i es el efecto generación (4 niveles: cero, primera, segunda y tercera), S_j es el efecto sexo, PO_k es el efecto orden de parto (3 niveles), c_{ikl} es el efecto de ambiente común (334

niveles), a_{ijklm} es el efecto aditivo y e_{ijklm} es el residuo del modelo. Se realizó un análisis bayesiano con el programa el programa TM (Legarra et al., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los parámetros de la distribución marginal posterior de las diferencias entre líneas para IMF. La línea H fue un 7% superior que la línea L en la 1ª generación, y un 9% en la 2ª y 3ª. Las diferencias entre líneas fueron como mínimo de 0.06, 0.08 y 0.07g/100g con un 80% de probabilidad ($k_{80\%}$) en la 1ª, 2ª y 3ª generación, respectivamente. Considerando un valor relevante para las diferencias un 0.05g/100g, el cual representa un tercio de la desviación típica del carácter, la probabilidad de relevancia fue moderada en la primera generación ($P_R=0.85$) y alta en la segunda y tercera ($P_R=0.96$ y 0.92, respectivamente). Estas diferencias representan una respuesta a la selección del 9% de la media, de la que un 6.8% se obtuvo en la 1ª generación y un 2.2% en la 2ª. En conejos no se han llevado a cabo experimentos de selección por IMF. En otras especies como en cerdos (Suzuki et al., 2005b; Schwab et al., 2009) y en vacuno (Sapp et al., 2002) se ha observado también un aumento de IMF.

La estima de la heredabilidad fue moderadamente elevada (0.37; Tabla 2) aunque con una precisión baja (HPD_{95%} entre 0.19 y 0.59). No obstante, la heredabilidad fue como mínimo de 0.29 con una probabilidad del 80% y la probabilidad de ser superior a 0.20 fue del 97% ($P_{0.20}$). No se dispone de estimaciones de heredabilidad de la IMF en conejo. La heredabilidad estimada en este trabajo es similar a las estimas publicadas en la bibliografía (revisado por Sellier, 1998 en cerdos; revisado por Bertrand et al., 2001 en vacuno).

Las tendencias genéticas mostraron una repuesta a la selección de 0.033, 0.052 y 0.054 g/100g para la línea H, y -0.032, -0.046 and -0.051 g/100g para la línea L en la 1ª, 2ª y 3ª generación, respectivamente (Fig 1). Las tendencias genéticas dependen de la heredabilidad considerada. Para validar nuestros resultados, las tendencias genéticas fueron calculadas de nuevo con una heredabilidad con un valor garantizado a un 95% de probabilidad (0.22; Tabla 2). La respuesta obtenida fue similar a la obtenida con un valor de heredabilidad de 0.37. Las tendencias ambientales también fueron calculadas y fueron nulas para las tres generaciones de selección, de forma que la mejora en IMF puede ser atribuida al proceso de selección.

Como conclusiones, se ha observado una respuesta directa a la selección que ha sido simétrica en las líneas H y L. La heredabilidad estimada ha sido moderadamente alta con una elevada probabilidad de ser superior a 0.20. El modelo aplicado y la heredabilidad estimada han sido validados y los resultados obtenidos confirman que este carácter puede ser modificado por selección en conejo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertrand J. K., R. D. Green, W. O. Herring, & D. W. Moser. 2001. *J. Anim. Sci.* 79(Suppl.):E190-E200
- Legarra A., L. Varona, & E. López de Maturana. 2008. <http://snp.toulouse.inra.fr/~alegarra/>
- Saap R. L., J. K. Bertrand, T. D. Pringle, & D. E. Wilson. 2002. *J. Anim. Sci.* 80:2017-2022
- Schwab C. R., T. J. Baas, K. J. Stalder, & D. Nettleton. 2009. *J. Anim. Sci.* 87:2774-2780
- Sellier P. 1998. *The Genetics of the Pig*. CAB Int., New York, USA, 463-510
- Suzuki K., Kadowaki H., T. Shibata, Uchida H. & A. Nishida 2005a. *Livest. Prod. Sci.* 97:193-202
- Suzuki K., M. Irie, H. Kadowaki, T. Shibata, M. Kumagai, & A. Nishida. 2005b. *J. Anim. Sci.* 83:2058-2065
- Wood J.D., M. Enser, A.V. Fisher, G.R. Nute, P.R. Sheard, R.I. Richardson, S.I. Hughes & F.M. Whittington. 2008. *Meat Sci.* 78:343-358
- Zomeño C., V. Juste, & P. Hernández. 2012. *Meat Sci.* 91:155-159

Agradecimientos: A Verónica Juste y Federico Pardo por el trabajo técnico realizado. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2011-29831-C03-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación y PROMETEO/2009/125 de la Generalitat Valenciana.

Tabla 1. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre la línea alta y la línea baja para el contenido de grasa intramuscular (g/100g músculo).

G	D _{H-L}	HPD _{95%}		P	k _{95%}	k _{80%}	P _{0.05}
1	0.08	0.03	0.14	1.00	0.03	0.06	0.85
2	0.10	0.04	0.16	1.00	0.05	0.08	0.96
3	0.09	0.04	0.15	1.00	0.04	0.07	0.92

G: generación; D_{H-L}: mediana de la distribución marginal posterior de la diferencia; HPD_{95%}: región de mayor densidad posterior al 95% de probabilidad; P: probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero; k_{95%}: límite del intervalo [k, +∞) al 95% de probabilidad; k_{80%}: límite del intervalo [k, +∞) al 80% de probabilidad; P_{0.05}: probabilidad de que la diferencia sea mayor a 0.05 g/100g.

Tabla 2. Parámetros de la distribución posterior de la heredabilidad del contenido en grasa intramuscular.

Mediana	HPD _{95%}	k _{95%}	k _{80%}	P _{0.20}
0.37	0.19	0.59	0.22	0.29

Mediana: mediana de la distribución posterior de la heredabilidad; HPD_{95%}: región de mayor densidad posterior al 95% de probabilidad; k_{95%}: límite del intervalo [k, +∞) al 95% de probabilidad; k_{80%}: límite del intervalo [k, +∞) al 80% de probabilidad; P_{0.20}: probabilidad de que la diferencia sea mayor a 0.20.

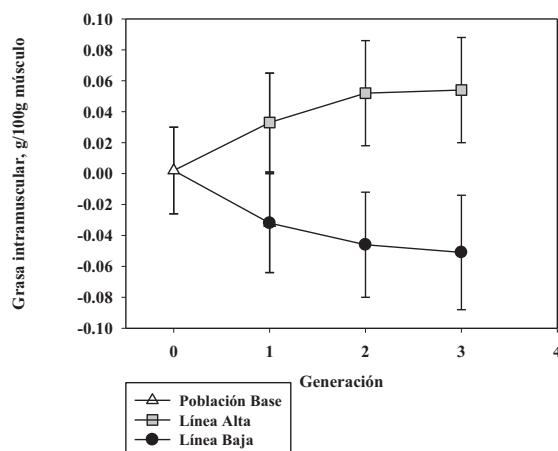


Figura 1. Medianas y desviaciones típicas de las distribuciones marginales posteriores de las medias genéticas para grasa intramuscular por generación.

DIVERGENT SELECTION FOR INTRAMUSCULAR FAT CONTENT IN RABBITS. DIRECT RESPONSE TO SELECTION

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the selection response on intramuscular fat (IMF) content after three generations of divergent selection. Selection was based on the phenotypic value of IMF content measured in two full sibs of the first parity. A total of 668 records were used to estimate the selection response on IMF and a pedigree of 1332 records was used to calculate heritability and genetic trends. Differences between lines for IMF were 0.08, 0.10 and 0.09 g/100g in the 1st, 2nd and 3rd generation, respectively. These differences represent a response of 9% of the mean. Heritability estimate for IMF was moderately high (0.37) with 97% of probability of being greater than 0.20. Genetic trends showed a direct response to selection of 0.05 g/100g in the high line and -0.05 g/100g in the low line. Selection response for IMF was similar using a guaranteed value of heritability with 95% of probability. The animal model applied and the heritability estimated in this study were validated and results confirmed that this trait can be improved through selection in rabbits.

Key words: heritability, intramuscular fat, rabbits, selection

HETEROGENEIDAD GENÉTICA DE LA LONGEVIDAD FUNCIONAL EN CINCO LÍNEAS DE CONEJOS

EL Nagar A. G.^{1,3*}, Sánchez J. P.², Mínguez C.¹, Baselga M.¹

¹Department of Animal Science, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera S/N, 46022, Valencia, Spain.

²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. Av. Alcalde Rovira i Roure 191, 25198, Lleida, Spain.

³Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Egypt.

*ayelna@posgrado.upv.es

INTRODUCCIÓN

Debido a su alta tasa anual de reposición, 120%, la longevidad funcional es un carácter muy importante en conejos (Rosell *et al.*, 2003). Se ha definido la longevidad funcional en conejos como el tiempo en días entre la primera palpación positiva y la muerte o eliminación por razones no productivas del animal (Sánchez *et al.*, 2004). Se han observado diferencias relevantes en los efectos genéticos directos para la longevidad funcional entre líneas maternas de conejos seleccionadas por tamaño de camada al destete y sus cruces (Piles *et al.*, 2006b; Ragab *et al.*, 2011). Se han obtenido estimas de heredabilidad entre bajas y moderadas (Piles *et al.*, 2006b; Sánchez *et al.*, 2008; EL Nagar *et al.*, 2012), si bien los estudios que analizan las diferencias del determinismo genético de la longevidad entre líneas de conejos son realmente escasos. El objetivo de este estudio es estimar las varianzas genéticas aditivas de la longevidad funcional y calcular sus correspondientes heredabilidades efectivas en cinco líneas de conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos de este trabajo (Tabla 1) proceden de animales de cinco líneas de conejos, cuatro de ellas son maternas (A, V, H y LP) y la quinta es una línea paternal (línea R), criadas en un núcleo de selección de la granja del departamento de Ciencia Animal (UPV). Las cuatro líneas maternas están siendo sometidas a un proceso de selección por tamaño de camada al destete aunque difieren en los criterios de su fundación (Ragab y Baselga 2011). La línea R, se ha seleccionado por velocidad de crecimiento diario postdestete y su origen es sintético, en el sentido de que procede de la fusión de otras dos poblaciones seleccionadas por caracteres de crecimiento (Estany *et al.*, 1992). Todo este material ofrece, *a priori*, una gran variabilidad y, precisamente, considerarla es parte del interés de este estudio. Los datos considerados de las líneas van desde su fundación hasta sus últimas generaciones de selección que son la 43, 38, 10, 8 y 32, respectivamente para las líneas A, V, H, LP y R. El manejo de todas las líneas es muy similar, las hembras se cubren aproximadamente 12 días después del parto y el destete tiene lugar a los 28 días. Únicamente para la línea R es ligeramente diferente, pues en las últimas generaciones las cubriciones tienen lugar mediante inseminación artificial y además se permite el apareamiento entre animales de distintas generaciones.

Para analizar los datos de cada línea por separado se utilizó el programa Survival Kit 6.0 (Ducrocq *et al.*, 2010) y en particular el módulo que implementa el modelo de Cox de riesgos proporcionales. El modelo que se utilizó fue el siguiente:

$$h_i(t|\mathbf{x}'_i(t)) = h_0(t) \cdot \exp\{ \mathbf{x}'_i(t)_{AE} \beta_{AE} + \mathbf{x}'_i(t)_{OPP*EF} \beta_{OPP*EF} + \mathbf{x}'_i(t)_{OPP*NV} \beta_{OPP*NV} + \mathbf{x}'_i(t)_{EF*NV} \beta_{EF*NV} + F_i \beta_F + \mathbf{z}'_i \mathbf{u} \}$$

Donde, $h_i(t|\mathbf{x}'_i(t))$ es el riesgo de muerte asociado al animal i , afectado por las covariables indicadas en el vector $\mathbf{x}'_i(t)$, en tiempo t ; $h_0(t)$ es la función del riesgo base. Los factores fijos dependientes de tiempo considerados fueron el efecto del Año-Estación (AE) definido cada seis meses; el efecto de la combinación entre el orden de las sucesivas palpaciones positivas que la hembra tiene y el estado fisiológico (OPP*EF) donde EF refleja la combinación entre el estado reproductivo de la hembra (preñada, no preñada y no se sabe)

y su estado lactacional (lactante o no lactante); el efecto de la combinación entre el orden de la palpación positiva y el número de nacidos vivos (OPP*NV); el efecto de la combinación entre el estado fisiológico y el número de nacidos vivos (EF*NV). Los factores independientes del tiempo considerados fueron el efecto de la consanguinidad (F), ajustada como una covariable continua; el efecto genético aditivo (u), que es un factor aleatorio para el que se asume una distribución normal multivariante con media cero y varianza $\mathbf{A}\sigma^2_A$ donde \mathbf{A} es la matriz del parentesco y σ^2_A es la varianza aditiva a estimar. El Survival Kit estima la varianza aditiva mediante un método bayesiano, que permite obtener varios estadísticos de su distribución marginal posterior: moda, media, desviación típica y coeficiente de simetría. Para analizar de manera conjunta los datos de todas las líneas se utilizó el mismo modelo pero sustituyendo el efecto AE por el efecto de la combinación entre la línea y el AE (L*AE). Una vez estimada la varianza aditiva del carácter, la heredabilidad efectiva (h^2_{ef}) (Yazdi et al., 2002) se calcula según la fórmula $h^2_{ef} = \sigma^2_A / \sigma^2_A + 1$. Si la proporción de registros censurados hasta un momento dado es p, la heredabilidad equivalente (h^2_{eq}), viene dada por la expresión $h^2_{eq} = \sigma^2_A / \sigma^2_A + (1/p)$ (Yazdi et al., 2002).

Tabla 1: Número de animales en los ficheros de datos y el pedigree en cada línea.

Línea	Hembras con dato	% Censura	Promedio vida (días) NO Censurados	Animales en pedigree
A	5102	36.6	154	6180
V	5144	34.8	176	6276
H	1156	55.5	138	1377
LP	1224	58.3	208	1425
R	2722	45.7	151	3760
Total	15348	40.8	164	19018

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 muestra los estadísticos de la distribución marginal posterior de la varianza aditiva de las distintas líneas, así como las respectivas heredabilidades efectivas calculadas basadas en la moda de la marginal posterior de la varianza aditiva.

Tabla 2: Moda, media, desviación típica (DT) y coeficiente de simetría de la distribución marginal posterior de la varianza aditiva. Heredabilidades efectivas (h^2_{ef}) de la longevidad funcional.

Línea	Moda	Media	DT	Simetría	h^2_{ef}
A	0.13	0.14	0.04	0.43	0.11
V	0.06	0.07	0.03	0.53	0.06
H	0.21	0.28	0.16	0.80	0.17
LP	0.002	0.05	0.06	1.08	0.002
R	0.21	0.23	0.08	0.46	0.18
Todos	0.14	0.15	0.02	0.24	0.13

La heredabilidad efectiva muestra valores de bajos a medios. Las líneas R y H son las que presentan estimas de heredabilidad más alta. La varianza aditiva de la línea LP es muy baja y como consecuencia también su heredabilidad, esto pudiera deberse a que el criterio de fundación de esta línea fue la híper-longevidad, lo que hizo que se aumentase la media de la longevidad en esta línea (Sánchez et al., 2006) a costa de una reducción de la variación en este carácter como consecuencia del propio proceso de selección. También es importante remarcar la importante asimetría de algunas de las distribuciones marginales posteriores, particularmente las de las líneas H y LP, que son para las líneas que se cuenta con un menor número de datos. Estas son las primeras estimas de varianza aditiva y heredabilidad que se obtienen para estas poblaciones. Previamente, Sánchez et al. (2004) estudiaron la

heredabilidad en una réplica de la línea V, escindida de la población considerada en nuestro estudio durante la generación 14. En este caso, la estima de la heredabilidad efectiva que ofrecieron fue 0.09. Es un valor ligeramente superior al estimado por nosotros, pero la comparación ha de hacerse con precaución ya que aquí la definición del carácter es diferente, el estado fisiológico se define de una manera diferente, y en el presente estudio se utilizó un modelo animal mientras que Sánchez et al. (2004) utilizaron un modelo padre-abuelo materno. En otro estudio de la mencionada réplica de la línea V, Sánchez et al. (2006), ofrecen una estima de heredabilidad efectiva de 0.12, en este caso se empleó el modelo animal, pero considerando un término residual, que en nuestro caso no hemos contemplado.

Piles et al. (2006a) estimaron la heredabilidad efectiva en dos líneas maternas, Prat y A1077, en ambos casos se utilizó un modelo animal y los valores obtenidos fueron 0.16 y 0.17, respectivamente, se puede decir que estos valores están en el rango de estimas obtenidas en nuestro trabajo. En la línea Caldes, seleccionada, al igual que la línea R, por velocidad de crecimiento al post-destete, se han estimado valores de heredabilidad superiores a 0.3 (comunicación personal M. Piles), un valor bastante más elevado que el obtenido por nosotros para la línea R (0.18).

Podemos concluir que la heterogeneidad en el determinismo genético de la longevidad funcional en las cinco líneas consideradas es importante y que en algunos casos se puede explicar como consecuencia de los criterios seguidos durante la fundación de las mismas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ducrocq, V., Sölkner, J., Mészáros, G. (2010). *9th World Congress on Genetics to Livestock Production, August 1-6, 2010, Leipzig, Germany* • EL Nagar, A. G., Sánchez, J. P., Ragab, M., Mínguez, C., Baselga, M. (2012). *10th World Rabbit Congress, Sharm El-Sheikh – Egypt*, 49-53. • Estany, J., Camacho, J., Baselga, M., Blasco, A. (1992). *Genet. Sel. Evol.* 24: 527-537. • Piles, M., Garreau, H., Rafel, O., Larzul, C., Ramon, J., Ducrocq, V. (2006a) *J. Anim. Sci.* 84:1658-1665 • Piles, M., J. P. Sánchez, J. Orengo, O. Rafel, J. Ramon, and M. Baselga. (2006b). *J. Anim. Sci.* 84:58-62. • Ragab M., y Baselga M. (2011). *Livest. Sci.* 136, 201-206. • Ragab, M., Sánchez, J. P., Mínguez, C., EL Nagar, A. G., Baselga, M. (2011). *XIV Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, España, 17 y 18 de mayo de 2011*, pp. 473-475. • Rosell J. M. (2003). *World Rabbit Sci.*, 11:157-169. • Sánchez, J. P., Baselga, M., Peiró, R., and Silvestre, M. A. (2004). *Livest. Prod. Sci.* 90:227-234. • Sánchez, J. P., Baselga, M., and Ducrocq, V. (2006). *J. Anim. Breed. Genet.* 123:180-185. • Sánchez, J. P., Theilgaard, P., Mínguez, C., and Baselga, M. (2008). *J. Anim. Sci.* 86:515-525. • Yazdi, M. H., Visscher, P. M., Ducrocq, V., Thompson, R., (2002). *J. Dairy Sci.* 85:1563-1577.

GENETIC HETEROGENEITY OF FUNCTIONAL LONGEVITY IN FIVE LINES OF RABBITS

ABSTRACT: The present study was performed to check the genetic heterogeneity among five lines of rabbits (A, V, H, LP and R) in terms of functional longevity. The lines A, V, H and LP are maternal lines founded on different criteria and being selected for litter size at weaning. The line R is a paternal line founded and being selected for daily growth rate. The data of each line was analysed using the survival analysis methodology (survival kit program), and the model of analysis was Cox-proportional hazard with frailty term as the additive value of the animals. Another combined analysis was did using the whole data set of all lines. The effective heritability (h^2_{ef}) \pm sd of functional longevity in each line was 0.11 ± 0.04 , 0.06 ± 0.03 , 0.17 ± 0.16 , 0.002 ± 0.06 and 0.18 ± 0.08 for A, V, H, LP and R lines, respectively. h^2_{ef} obtained from the combined analysis of all lines was 0.13 ± 0.02 . It can be concluded that the genetic heterogeneity between the studied lines is important.

Keywords: Rabbits, Longevity, Heritability, Survival analysis.

INTERACCIÓN G_xE PARA PESO POST-DESTETE EN CONEJO DE CARNE ENTRE RÉGIMENES DE ALIMENTACIÓN *AD LIBITUM* Y RESTRINGIDA

Piles M.*, Ramon J., Rafel O., Sánchez J. P.

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140, Barcelona, Spain.

*miriam.piles@irta.es

INTRODUCCIÓN

La mejora de la eficiencia alimentaria es uno de los retos más importantes en la producción de carne de especies prolíficas debido al elevado porcentaje del total de costes que supone la alimentación (70-80% en conejo: Moura et al., 1997). No obstante, la consideración directa de este carácter en programas de mejora genética ha sido prácticamente nula, principalmente por la dificultad de disponer de registros individuales del consumo durante el periodo de engorde. Dado que este carácter está positivamente correlacionado con la velocidad de crecimiento o el peso al final del periodo de cebo, se ha asumido que la selección para estos caracteres daría lugar a una mejora indirecta de la eficiencia alimentaria. Sin embargo, las estimaciones recientes de la correlación genética entre velocidad de crecimiento e índice de conversión, tanto en conejos (Piles et al. 2004) como en cerdos (Clutter y Brascamp, 1998 citado por Bidanel et al., 2010), indican que el valor de este parámetro podría no ser lo suficientemente elevado como para dar lugar a una respuesta correlacionada relevante en eficiencia alimentaria. En estas circunstancias, merece la pena analizar las posibilidades y beneficios de la implementación de procedimientos de selección alternativos, teniendo en cuenta las condiciones de producción en cuanto alojamiento, presencia de enfermedades, etc. En este sentido, en particular en la especie cunícola, sería interesante considerar las posibilidades de selección en condiciones de racionamiento alimentario ya que éste tiene un efecto positivo sobre la salud de los animales (Cachaldora y col. 2011) en presencia de enfermedades que generan trastornos digestivos, como la enteropatía epizoótica del conejo, que ha ocasionado una elevada mortalidad en toda Europa durante los últimos 10 años. Sin embargo, no hay ningún estudio en conejo que evalúe las posibilidades de selección por peso individual bajo alimentación racionada o la existencia de interacción entre el genotipo y el tipo de alimentación, lo cual constituye el objetivo del presente trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales procedían de la línea Caldes, actualmente seleccionada por velocidad de crecimiento durante el periodo de cebo con alimentación *ad libitum*. Se engordaron dos grupos de gazapos bajo las mismas condiciones ambientales y de manejo, con la única excepción del régimen alimenticio, que fue de dos tipos: 1) Alimentación *ad libitum* (AL); 2) Alimentación racionada al 75% del consumo a voluntad (AR), pero ambos con una dieta estándar durante las 4 semanas de duración del engorde (destete 32d; sacrificio 60d). Durante este periodo, los animales se encontraban alojados en una nave al aire libre, con cubierta y toldos de protección. Los animales de una misma camada eran distribuidos en jaulas colectivas de 8 individuos, asignadas a cada uno de los dos tratamientos e intercaladas entre sí. La distribución de los gazapos se hacía considerando también su tamaño para así tratar de que uniformizar éste dentro de una misma jaula. Se dispuso de 1112 y 1104 gazapos de 344 y 347 camadas, alimentados a voluntad o con alimentación restringida, respectivamente. Semanalmente se registró el peso de los individuos de la jaula, y el consumo de pienso de los alimentados a voluntad. Al final del periodo de engorde, se volvían a pesar los animales individualmente. La cantidad de pienso que había que suministrar al grupo de alimentación restringida, se calculaba multiplicando por 0.75 la cantidad de pienso consumido durante la semana anterior más un 10 % de ésta para tener en cuenta la diferencia de consumo debido a su mayor tamaño.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis bi-variado de regresión aleatoria considerando el peso del animal bajo distintos regímenes alimentarios como caracteres distintos, y la edad como variable independiente: Este modelo incluía los siguientes factores para cada carácter: 1) Factores fijos: lote (4 niveles), tamaño de camada (10 niveles), orden de parto (4 niveles), edad (covariable). 2) Factores aleatorios: intercepto y pendiente del efecto genético aditivo, intercepto y pendiente del efecto permanente de animal, intercepto y pendiente del efecto de camada de origen, e intercepto y pendiente del efecto de día de control. Además el modelo incluía un residuo que era independiente entre caracteres. El efecto de día de control permite parcialmente tener en cuenta las covarianzas ambientales entre caracteres, ya que al no haber animales con registros en ambos tratamientos no es posible establecer covarianza residual. Se realizó un análisis bayesiano utilizando el programa gibbs2f90 de Misztal y col. (2002). El número de iteraciones fue de 1.000.000 y se desecharon las 600.000 primeras, para guardar una de cada 20 muestras de cada parámetro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de restricción realmente aplicado en cada uno de los 4 lotes de animales fueron: 76, 76, 77 y 71 % y la media general 75%. Este valor se ajusta perfectamente al deseado a pesar de que semanalmente se observaba una gran variación en el nivel de restricción debido al cambio de las condiciones ambientales, por encontrarse los animales en una nave abierta que dispone un techado y toldos laterales como única protección del exterior.

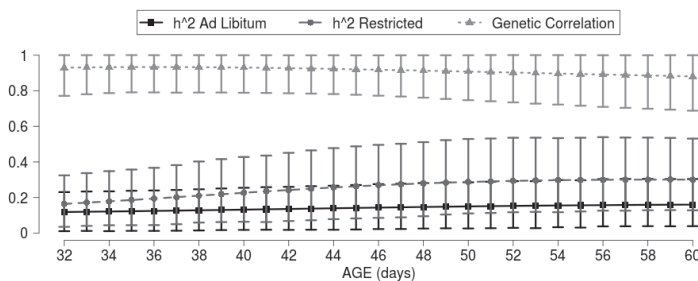


Figura 1. Heredabilidades y correlaciones genéticas del peso vivo de los gazapos a diferentes edades del periodo de engorde en condiciones de alimentación a voluntad o restringida. Las barras indican los intervalos HPD_{95%}.

La Figura 1 muestra la evolución de los valores de la heredabilidad a lo largo del periodo de engorde del peso vivo individual con alimentación *ad libitum* y restringida, considerados aquí como caracteres distintos. En esta misma figura se presenta el valor de la correlación genética entre ellos, a diferentes edades de los gazapos. A pesar de que las estimas son imprecisas, ya que aun no se dispone de todos los datos del experimento, se observa claramente que el valor de la correlación genética entre ambos caracteres es elevado, siendo el valor mínimo de 0.88 a los 60 d de edad y el valor máximo de 0.93 35 d de edad. Aunque con los datos obtenidos de momento no podemos decir que sean diferentes en estos dos puntos, la mayor correlación el inicio del engorde se debería a que esta es una etapa de transición entre la lactación y la alimentación únicamente sólida, por lo que el comportamiento alimentario en esta etapa es muy irregular en ambos grupos de animales, y es muy difícil realizar un buen ajuste del nivel de racionamiento. Respecto a las heredabilidades podemos decir que los valores de la medias de la distribución posterior son muy similares a edades tempranas aunque a edades más avanzadas empiezan a diferenciarse; así, al final de la fase de engorde (60 días) la estima de heredabilidad para el peso vivo bajo alimentación restringida es casi el doble (0.30) que a esa misma edad bajo alimentación a voluntad. Esta diferencia, aunque relevante, no podemos decir que sea estadísticamente distinta de cero. Así pues, será necesario esperar a que se hayan recogido un mayor número de datos para determinar si estas medias posteriores se mantienen, al tiempo que se incrementa la precisión de las estimas. Si con la inclusión de los nuevos

datos las diferencias se mantienen y la precisión aumenta, los resultados indicarían que podría existir una interacción del genotipo con el régimen de alimentación que podría conducir a una mayor respuesta a la selección por crecimiento cuando se restringe la cantidad de pienso diaria suministrada a los gazapos frente a la situación en la que éstos se alimentan a voluntad. Teniendo en cuenta los valores de las medias de las distribuciones marginales posteriores, podríamos decir que dicha interacción se debería básicamente a un efecto de escala, debido a la diferencia en la varianza genética entre ambos caracteres, ya que la parte de dicha interacción que es debida esencialmente a una correlación genética menor que 1 sería mucho menor.

	REGIMEN ALIMENTARIO			
	AD LIVITUM		RESTRINGIDO	
	Intercepto	Pendiente	Intercepto	Pendiente
PM	0.108	0.127	0.117	0.19
PSD	0.054	0.054	0.057	0.069
HPD _{95%}	0.019, 0.215	0.037, 0.235	0.03 0.236	0.069 0.323

La tabla muestra los estadísticos descriptivos de las distribuciones marginales posteriores de la heredabilidad del intercepto y la pendiente bajo ambos regímenes alimentarios. La pendiente está estrechamente relacionada con la velocidad de crecimiento. De confirmarse los valores de las medias posteriores, podría decirse que la heredabilidad de la velocidad de crecimiento en condiciones de racionamiento es mayor que cuando los animales se alimentan a voluntad. Piles y Tusell (2011) obtuvieron una estima de la heredabilidad de la velocidad de crecimiento en condiciones de alimentación a voluntad de 0.16.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bidanel, J.P et al.. (2010). Proc. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig, Germany, August 1-6th, 2010. • Cachaldora, P et al. (2011) Proc: XXXVI Symposium de Cunicultura, Mayo 2011, Peñíscola, Spain. • Clutter AC. and Brascamp EW. 1998. En *The Genetics of the Pig*, Eds. MF Rothschild y A Ruvinsky, CAB International, Oxford, UK. pp. 427-462. • Moura, A.S.A.M.T., et al (1997). JAS. 75: 2344-2349. • Misztal, I., et al. (2002). Proc. 7th World Congress on Genetics to Livestock Production, Montpellier, France. • Piles, M., et al. (2004). JAS, 82:654-660. • Piles, M.; Tusell, L. (2011). JABG, 129:298–305

Agradecimientos: Este proyecto ha estado financiado por el INIA (RTA2011-00064-00-00)

INTERACTION BETWEEN THE GENOTYPE AND THE FEEDING REGIME FOR POST-WEANING LIVE WEIGHT IN RABBIT

ABSTRACT: The aim of this research was to estimate the effect of the interaction between the genotype and the feeding regime in order to know whether the selection for growth could be more effective by applying quantitative food rationing during fattening period than when animals are fed *ad libitum*. 2216 rabbits from Caldes line coming from 691 litters were distributed in collective cages assigned equally to both types of feeding regime, a total of 12777 individual weights were recorded. The kits of the same litter were equally distributed into both treatments ensuring that the kits of the same cage had a similar initial weight. For statistical analysis we used a two-trait random regression animal model to fit the weight of the animals during post-weaning growth under different diet as different characters, the independent variable in this random regression was the age of the animal. This model included the fixed effects of age, batch, order of birth and litter size, and the random effects of the intercept and slope for additive genetic, animal permanent, common litter and date of control effects. A Bayesian analysis was performed. Although estimates were very inaccurate, results could indicate that it exists an interaction between the genotype and the feeding regime basically due to a scale effect because of the difference in the additive variance under different conditions. **Keywords:** Rabbits, GxE, Growth, Feeding Regime

COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE EN TRES LÍNEAS MATERNALES DE CONEJOS

EL Nagar A. G.^{1,3*}, Ragab M.⁴, Mínguez C.¹, Sánchez J. P.², Baselga M.¹

¹Department of Animal Science, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera S/N, 46022, Valencia, Spain.

²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. Av. Alcalde Rovira i Roure 191, 25198, Lleida, Spain.

³Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Egypt.

⁴Poultry Production Department, Faculty of Agriculture, Kafr El-Sheikh, Kafr El-Sheikh University, Egypt.

*ayelna@posgrado.upv.es

INTRODUCCIÓN

Los gazapos hasta los 18-19 días de edad, dependen exclusivamente de la leche de sus madres. Por esta razón la producción de leche de las conejas es un factor importante en la producción de conejos (Iraqi et al., 2010). La producción comercial de carne de conejos está basada en el uso de hembras cruzadas que producen los gazapos tras ser inseminadas por machos de líneas maternales. Estas hembras son el resultado del cruce entre dos líneas maternales que se seleccionan por caracteres relacionados con el tamaño de la camada y/u otros más o menos relacionados con la producción de leche y el crecimiento de los gazapos (Garreau et al., 2004). En cualquier caso, la producción y composición de la leche de ellas dependerá en alto grado de los correspondientes valores de las líneas maternales que las originan. Por ello, el objetivo de este estudio es determinar las diferencias en cuanto la producción y la composición química de la leche entre tres líneas maternales de conejos de interés en la producción comercial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos de este estudio proceden de animales de tres líneas maternales de conejos (A, V y LP), criadas en un núcleo de selección de la granja del departamento de Ciencia Animal (UPV). El experimento empezó en Diciembre 2011 y se acabó en Junio 2012. Después de su fundación todas las líneas han sido seleccionadas para el tamaño de camada al destete y en el momento del inicio de la experiencia los procesos de selección se encontraban en las generaciones 42, 37 y 8 para las líneas A, V y LP, respectivamente. Respecto al manejo, todas las hembras se montan aproximadamente 12 días después del parto El destete tiene lugar a los 28 días. Se ha controlado la producción de leche de 194 hembras y de 172 de ellas su composición. La producción de leche fue medida los días 1, 2, 3 y 4 durante la primera semana de lactancia, los 8, 9, 10 y 11 durante la segunda semana y los días 15, 16 y 17 durante la tercera semana. La producción de leche se midió utilizando el método de doble pesada de la coneja, antes y después de amamantar a los gazapos (Lukefahr et al., 1983) Los gazapos se separan de sus madres durante los días de medida, salvo en el momento en que se controla el amamantamiento. La producción diaria de leche en cada semana se calculó como el promedio de la producción medida durante los días de control de la semana. El día 18 de lactación, por la mañana, se tomaron muestras de leche para analizar su composición (% de grasa, % de proteína, % de cenizas, % de lactosa y sólidos totales). Las muestras se recogieron manualmente mediante un ligero masaje de la glándula mamaria después de dos minutos de la inyección de 0,5 ml de oxitocina en la vena marginal de la oreja, obteniéndose volúmenes de 25-30 ml por coneja. La grasa se determinó inmediatamente después de la recogida de muestras por el método de Gerber (Case et al. 1985), la proteína por el estándar de micro-Kjeldahl y los sólidos totales y cenizas siguiendo los procedimientos de la AOAC (1980). La lactosa se determinó mediante sustracción. Para analizar los datos se utilizaron modelos mixtos cuyas componentes de varianza se estimaron por el método REML (REMLf90., Misztal et al., 2002) y los contrastes de interés por el método de mínimos cuadrados generalizados (Blupf90., Misztal et al., 2002). El modelo que se utilizó para la producción diaria de leche fue: $Y_{ijk} = LS_i + OP_j + PE_k + \beta_1(NV_k - \mu_1) + \beta_2(PC_k - \mu_2) + e_{ijk}$. Donde, Y_{ijk} es la producción

diaria del coneja k, obtenida en la línea-semana i, orden del parto j; LS_i es el efecto de la combinación línea-semana con 9 niveles; OP_j es el orden del parto con 2 niveles (1=3, 4,5 ; 2=6, 7, 8,9); PE_k es el efecto aleatorio permanente de la coneja sobre sus datos en las tres semanas; β_1 es el coeficiente de regresión de la covariable número de nacidos vivos; NV_k es el número de nacidos vivos; μ_1 es la media del número de nacidos vivos; β_2 es el coeficiente de regresión de la covariable peso de la coneja al parto; PC_k es el peso de la coneja al parto; μ_2 es la media del peso de las conejas; e_{ijk} es el residual. Para ver las diferencias reales entre líneas sin corregir por el peso de las conejas, ni por el número de nacidos vivos se utilizó el mismo modelo pero sin covariables. El modelo que se utilizó para la composición de la leche fue: $Y_{ijk} = L_i + OP_j + \beta_1(NV_k - \mu_1) + \beta_2(PC_k - \mu_2) + e_{ijk}$. Donde L_i es el efecto de la línea con tres niveles y el resto de los términos como en el modelo anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La repetibilidad de la producción diaria de leche en las tres semanas y dentro de la misma lactación es 0.55. Los contrastes entre líneas, semanas y órdenes de parto para la producción diaria de leche se muestran en la Tabla 1. La línea LP da más leche que las líneas V y A. Las diferencias entre las líneas son significativas. La superioridad de estas tres líneas con respecto a otras medias citadas puede deberse en parte a la elevada prolificidad de estas líneas seleccionadas por el tamaño de la camada al destete (Ragab Y Baselga 2011). McNitt y Lukefahr (1990) estimaron que la producción de leche se incrementa conforme aumenta el tamaño de camada y alcanza su máxima producción (219.6 g) con un tamaño de camada de 12 gazapos. Esto concuerda con lo expuesto por Szendró y Maertens (2001), quienes indicaron que la producción de leche de la coneja está, en parte determinada por el tamaño de camada. Las diferencias entre semanas fueron significativas, ya que la producción de leche aumenta con el tiempo del parto hasta la tercera semana que tiene la máxima producción McNitt y Lukefahr. (1990). No hubo efectos significativos de orden de parto.

Tabla 1: Producción diaria de leche (g/d). Diferencias entre líneas, semanas y órdenes de parto.

	Con covariables	Sin covariables	β_1	β_2
Media general, β	221.74±2.87	220.94±3.17	7.03±1.08	0.02±0.0
Contraste			Δ_{NV}	Δ_{PC}
A – V	-11.30±6.65	-15.03±7.20	-0.86	128
A – LP	-29.18±7.54	-41.65±8.08	-1.17	-138.7
V – LP	-17.87±7.06	-26.62±7.42	-0.30	-266.7
1ª semana – 2ª semana	-100.89±2.95	-100.88±2.95		
1ª semana – 3ª semana	-156.61±2.95	-156.49±2.95		
2ª semana – 3ª semana	-55.61±2.95	-55.61±2.95		
(3ª-5ª) - (6ª-9ª) parto	0.24±6.18	4.40±6.75	0.29	59.56

* Efecto significativamente diferente de 0, $\alpha=0.05$, β_1 = coeficiente de regresión del número de nacidos vivos (g/d. gazapo), β_2 = coeficiente de regresión del peso de la coneja (g/d. g), Δ_{NV} = diferencia del número de nacidos vivos entre líneas y partos, Δ_{PC} = diferencia del peso de coneja entre líneas y partos.

Tabla 2: Composición de leche. Diferencias entre líneas y órdenes de parto.

	Grasa%	Proteína%	Cenizas%	Lactosa%	ST%
Media general	14.60±0.17	11.11±0.07	1.89±0.04	2.67±0.12	30.27±0.24
Contraste					
A – V	-0.71±0.39	-0.02±0.17	0.12±0.09	-0.12±0.27	-0.72±0.55
A - LP	-0.12±0.345	0.36±0.19	-0.25±0.11	0.04±0.32	0.02±0.64
V - LP	0.59±0.42	0.38±0.18	-0.38±0.10	0.16±0.29	0.75±0.59
(3ª-5ª)-(6ª-9ª) parto	0.15±0.38	0.04±0.16	-0.22±0.09	0.36±0.27	0.32±0.54

*= Efecto = significativamente diferente de 0, $\alpha=0.05$, ST= Sólidos Totales.

La Tabla 2 muestra los contrastes de las líneas para los caracteres de composición de la leche. Las diferencias entre líneas no fueron significativas para % de grasa, % de lactosa y % de sólidos totales. Las diferencias entre V y LP en % de proteína, y entre LP y las otras dos líneas en % de ceniza, fueron significativas. Aunque la línea LP tiene la superioridad en producción de leche durante las tres semanas sobre las líneas A y V, sus componentes de leche no se vieron afectados y las diferencias con las otras líneas no fueron significativas. Las medias generales del presente estudio eran similares a los indicaron por Al-Sobayil et al. (2005) en diferentes grupos genéticos de conejos (Gabali Saudí, línea V y diferentes cruces entre ellos) planteadas en Arabia Saudita donde tenían $12,9 \pm 2,3$, $12,0 \pm 1,5$, $2,2 \pm 0,3$ y $29,1 \pm 3,0\%$ de grasa, proteína ceniza y TS, respectivamente teniendo en cuenta que tomaban las muestras de leche el día 15 de lactación. El-Sayiad et al. (1994) muestran que no había diferencias en la composición de leche entre las razas Neozelandesa blanca (NZW) y California (CAL) y encontraron medias similares al presente estudio que eran 14.0, 13.6, 1.9, 2.1 % de grasa, proteína, lactosa y cenizas % en NZW y 14.0, 14.3, 2.0, 2.2 % de los mismos componentes en la raza CAL, respectivamente. No hubo efectos significativos de orden de parto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Al-Sobayil K.A., Al-Homidan A.H., Khalil M.H., Mehaia M.A. (2005). *Livestock Research for Rural Development* 17, (10). • AOAC (1980). Official Methods of Analysis. 13th Edition, Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D. C., USA. • Case R.A., Bradley R.L., y Williams R.R.(1985). American Public Health Association, Washington, D. C., USA, pp.327-402. • El-Sayiad Gh A., Habeeb A. A. M., El-Maghawry A. M.(1994). *Animal Production* 58:153-157. • Garreau H., Piles M., Larzul C., Baselga M., Rochambeau H. (2004). In *Proc. 8th World Rabbit Congress, 2004 September, Puebla, Mexico, 14-25*. • Iraqi M.M., García M.L., Khalil M.H., Baselga M. (2010). *Journal of Animal Breeding and Genetics* 127: 242-248. • Lukefahr S., Hohenboken W.D., Cheeke P.R., Patton N.M. (1983) *J. Anim. Sci.*, 57, 1100-1107. • McNitt J.I., Lukefahr. S.D. (1990). *J. Anim. Sci.*, 68, 1505-1512. • Misztal I., Tsuruta, S., Strabel T., Auvray B., Druet T., Lee, D.H. (2002). Commun. NO. 28-07 in *7th World Congress on Applied Livestock Production, Montpellier, France*. • Ragab M., y Baselga M. (2011). *Livest. Sci.* 136, 201-206. • Szendrő y Maertens (2001).(a review). *Acta Agraria Kaposváriensis*, 5 (2), 1-21.

COMPARISON OF MILK PRODUCTION AND COMPOSITION IN THREE MATERNAL LINES OF RABBITS

ABSTRACT: A study was performed to compare three Spanish maternal lines of rabbits (A, V and LP) in terms of daily milk production during the first three weeks of lactation and the gross chemical composition of milk. The composition traits were fat (%), protein (%), ash (%), lactose (%) and total solids (%). Data of milk yield were analysed using mixed models whose variance components were estimated by REML and the contrasts of interest by the generalized least squares method with and without covariates; the covariates were number born alive (NBA) and doe weight at kindling (WDK). Data of milk composition was analysed by the same way but only with covariates. The coefficients of regression were 7.03 ± 1.08 (g/d. kit) and 0.02 ± 0.0 (g/d. g) for NBA and WDK, respectively. The LP line had a superior daily milk yield during the three weeks of lactation over the other two lines. The parity effect was not a significant source of variation neither for milk yield nor for milk composition traits. The differences between lines were not significant for milk composition traits except for ash % between LP line and the other lines, for protein % between V and LP lines. The overall mean of daily milk yield was 221.74 ± 2.87 (g/d). For milk composition, the overall mean was 14.6 ± 0.17 , 11.11 ± 0.07 , 1.89 ± 0.04 , 2.67 ± 0.12 and 30.27 ± 0.24 % for fat, protein, ash, lactose and total solids %.

Keywords: Rabbits, Maternal lines, Milk production, Milk composition.

COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE SACRIFICIO EN CONEJOS CRUZADOS PROCEDENTES DE CUATRO LÍNEAS MATERNALES

Mínguez, C. ¹, Gutiérrez-Valcárcel, A. ¹, Sánchez, J. P. ³, EL Nagar A.G. ^{1,4}, Ragab, M. ²
Baselga, M. ¹

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, U. Politécnica de Valencia, España.

²Poultry Depart., Fac. of Agric., Kafr El-Sheikh University, Egipto.

³Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. Lleida, España.

⁴Department of Animal Production, Fac. of Agric. at Moshtohor, Benha University, Egipto
·carminba@posgrado.upv.es

INTRODUCCIÓN

El tipo de cruce más utilizado en la producción cunícola es el cruzamiento a tres vías, es decir, para obtener el gazapo de engorde se realizan dos cruzamientos con tres líneas especializadas. El primero de ellos es entre dos líneas maternas, para la producción de la hembra cruzada. En el segundo, estas hembras cruzadas se montan o inseminan con machos de una línea paterna para obtener el gazapo de engorde. El criterio de selección de las líneas maternas en conejo de carne es normalmente el tamaño de camada al nacimiento o al destete. Sin embargo, es importante tener en cuenta cómo se ven afectados los caracteres de matadero en los cruces de estas líneas, ya que aportan un 50% de sus genes a los conejos destinados a matadero.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los caracteres de matadero (peso vivo, peso de la canal caliente, peso de la piel, peso de las vísceras y rendimiento) de conejos procedentes de un cruce a tres vías entre cuatro líneas maternas y una paterna, todas ellas de interés en la producción cunícola.

MATERIAL Y METODOS

En este estudio se han evaluado los caracteres de sacrificio (Peso Vivo, Peso de la Piel, Peso de las Vísceras, Peso de la Canal Caliente y Rendimiento a la Canal) de 1360 gazapos nacidos del cruce a tres vías entre hembras procedentes de los cruzamientos simples de cuatro líneas maternas (A, V, H y LP) y el macho terminal de la línea R. No se hizo distinción entre un cruce y su recíproco. Estas líneas fueron fundadas en la granja experimental de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Las líneas maternas son seleccionadas por número de destetados y actualmente se encuentran en las generaciones 43, 38, 22 y 8 respectivamente. La línea R, es seleccionada por ganancia media diaria post-destete y actualmente se encuentra en la generación 32.

Las madres estuvieron agrupadas en seis cruces (AxV, AxH, AxLP, VxH, VxLP y HxLP), y un grupo de hembras de la línea V como población control. Los gazapos fueron engordados en dos granjas comerciales, situadas una de ellas en Rioseco de Tapia (León) y la otra en Altura (Castellón).

El manejo llevado en estas dos granjas fue el mismo. El destete se produjo a los 28 días de edad. Los gazapos se identificaron individualmente mediante tatuaje y fueron alojados en jaulas colectivas de 8 animales, alimentándose con un pienso comercial de cebo *ad libitum*, hasta el día 63 en que fueron sacrificados.

El sacrificio se realizó siguiendo las normas de bienestar animal, tras el correspondiente aturdimiento eléctrico. En el momento del sacrificio se anotaron los valores del Peso Vivo, Peso de la Piel, Peso de las Vísceras y, tras un periodo de 30 min., el Peso de la Canal Caliente. También se obtuvo el rendimiento como porcentaje que representa el Peso de la Canal Caliente respecto al Peso Vivo del animal.

El número de animales sacrificados por cruce fue de 201 para AxLP, 205 para HxA, 183 para AxV, 190 para HxLP, 199 para VxLP, 192 para HxV y 190 para VxV.

La estimación de las diferencias entre los cruces y la línea V se realizó con el siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = S_i + GGG_{jk} + \beta NV_l + Co_m + e_{ijklm}$$

donde: Y_{ijklm} es un registro del carácter del animal, S_i es el efecto del sexo, macho o hembra, sobre el carácter medido. GGG_{jk} es el efecto de la combinación de la granja con el grupo genético, habiendo dos y siete niveles respectivamente. NV_l es la covariable número de nacidos vivos de la camada en la que nació el animal, β es el coeficiente de regresión correspondiente. Co_m es el efecto aleatorio de la camada en la que nació el animal. e_{ijklm} es el error.

Para la estimación de componentes de varianza se utilizó el método REML (REMLF90; Misztal *et al.*, 2002) y, posteriormente, se llevaron a cabo los análisis mediante mínimos cuadrados generalizados (BLUPF90; Misztal *et al.*, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el conjunto del experimento, las medias sin corregir obtenidas para cada una de las medidas son: 2119 g. para el Peso Vivo, 231 g. para el Peso de la Piel, 403 g. para el Peso de las Vísceras, 1234 g. para el Peso de la Canal Caliente y 58% para el Rendimiento. Los valores obtenidos para Peso Vivo y Rendimiento se encuentran dentro del rango de comercialización de la carne de conejo (MAGRAMA, 2012).

Los resultados obtenidos muestran diferencias importantes según la granja en que se engordaron los animales. Los animales alojados en la granja de León tienen unos valores más elevados en todos los caracteres debido a la localización, acondicionamiento y nivel técnico en ella, excepto para el Peso de las Vísceras debido a que la distancia entre granja y matadero fue mayor.

En cuanto al sexo, los análisis muestran diferencias significativas pero la magnitud de éste no es importante, ya que estas diferencias son importantes cuando los animales superan las 15 semanas de vida (Gómez y Blasco, 1992).

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos para los contrastes entre los cruces de las distintas líneas maternas con el control (VxV).

Tabla 1. Valores del contraste entre los cruces simples de líneas maternas.

Contraste	PV (g.)	PP (g.)	PVisc (g.)	PC (g.)	Rendi (%)
(AxLP)-(VxV)	6.4±38.1	8.9±5.3	11.8±7.6	-14.3±24.5	-0.86±0.28*
(AxH)-(VxV)	1.3±38.0	2.0±5.3	6.4±7.6	-7.5±24.4	-0.45±0.28
(AxV)-(VxV)	-4.1±38.4	9.4±5.4	4.6±7.7	-12.8±24.7	-0.52±0.28
(HxLP)-(VxV)	-0.2±37.6	7.8±5.3	0.1±7.5	-1.1±24.2	-0.11±0.28
(VxLP)-(VxV)	5.5±37.8	8.3±5.3	3.1±7.5	-9.4±24.3	-0.63±0.28*
(HxV)-(VxV)	-15.4±38.6	3.0±5.4	-5.8±7.7	-9.5±24.8	-0.03±0.28

PV = P. Vivo; PP = P. Piel; PVisc = P. Vísceras; PC = P. Canal Caliente; Rendi = Rendimiento; *Significativamente diferente con $\alpha=0.05$.

Los contrastes realizados no muestran diferencias importantes en los caracteres estudiados. Por ello se puede decir que la elección de uno u otro como cruce maternal en las granjas comerciales no supondrá cambios relevantes en la producción final en lo que respecta a crecimiento y rendimiento a la canal.

Se han estudiado caracteres de crecimiento pero utilizando las líneas maternas como tales (Mínguez *et al.*, 2012), obteniéndose como resultado que las líneas H y LP resultaron más pesadas que las líneas V y A. Entre la V y la A no se encontraron diferencias relevantes. Pese a estos resultados, estas diferencias no se detectaron en

los gazapos procedentes de los cruces de estas líneas, debido a que el valor esperable de ellas es demasiado pequeño para resultar significativo con los errores típicos obtenidos en este experimento.

Analizando los datos podemos decir que no existen diferencias relevantes en los animales de matadero, independientemente del cruce maternal que se realice, en cuanto al carácter peso vivo que, hoy en día, es por el que los ganaderos son remunerados. El hecho de que no existan diferencias significativas en cuanto a Peso Vivo se considera un resultado positivo ya que todos ellos pueden considerarse adecuados para la producción comercial.

Cabe destacar que también se realizaron estos mismos análisis con un modelo similar pero sin tener en cuenta la covariable Nacidos Vivos, obteniéndose resultados similares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gómez, E. A., Blasco, A. (1992). Growth curves of lines selected on growth rate for a litter size. *5th World Rabbit Congress*, Oregon State University, Corvallis, USA 872-878.
- MAGRAMA, (2012). Encuesta Nacional de Cunicultura 2008-09. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/ganaderia/encuesta-nacional-cunicultura/default.aspx>.
- Minguez, C., Sánchez, J. P., Ragab, M., El Nagar, A. G., Baselga, M. (2012). Growth traits in four maternal lines. *10th World Rabbit Congress*, Sharm El-Sheikh-Egypt, 55-59.
- Misztal, I., Tsuruta, S., Strabel, T., Auvray, B., Druet, T., Lee, D. H. (2002). BLUPF90 and related programs (BGF90). Commun. No. 28-07 in *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France.

SLAUGHTER TRAITS COMPARISON IN CROSSBRED RABBITS RESULTING FROM FOUR MATERNAL LINES

ABSTRACT: This study evaluated the slaughter traits (live weight, commercial skin weight, full gastrointestinal weight, hot carcass weight and carcass yield) of 1360 rabbits, sired by males of the paternal line R. The dams were sorted in seven genetic groups: six simple crosses (AXV, AxH, AxLP, VXH, VxLP and HxLP) between the maternal lines (A, V, H and LP) and females of the line V, used as a control population. The rabbits were raised in two commercial farms. The management in these two farms was the same. Weaning was at 28 days. Subsequently, the animals were housed in collective cages of 8 rabbits, until day 63 when they were slaughtered.

At the time of slaughter, the traits recorded were: live weight, skin weight, gastrointestinal weight and, after a period of 30 min., the hot carcass weight. The results showed significant farm differences. For sex, also, showed significant differences but the values were not important. Finally the genetic group effect was not significant for the characters studied. The fact that there were no significant differences in live weight is considered a positive result because any of the crossbred females can be used in commercial farms with similar productive results.

Keywords: Rabbit, crosses, characteristics of the carcass, maternal lines.

PARÁMETROS GENÉTICOS DE LA MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA EN CONEJO

Lavara¹, R., Vicente, J.S., Marco-Jiménez, F., Baselga, M.

¹Universidad Politécnica de Valencia. Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Camino de Vera s/n, 46071 Valencia. rlavara@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

La morfometría de la cabeza espermática presenta diferencias entre especies (Gage, 1998) y entre individuos dentro de la misma especie (Ward, 1998), incluso algunos autores postulan que la morfometría espermática podría ser específica para cada individuo (Morrow y Gage, 2001).

En conejo se dispone de estimas de heredabilidades y repetibilidades de las variables relacionadas con las características seminales y del eyaculado (Brun et al., 2009; Lavara et al., 2011 y 2012; Tusell et al., 2012), así como su relación con la ganancia media diaria durante el periodo de engorde (Lavara et al., 2011 y 2012; Tusell et al., 2012). Sin embargo, son escasos los trabajos en los que se estudien las bases genéticas de la morfometría espermática y no existen estudios sobre la correlación genética entre los distintos caracteres morfométricos y el criterio de selección en líneas comerciales de conejo.

El presente trabajo tiene como objetivo estimar la repetibilidad y heredabilidad de las dimensiones de la cabeza del espermatozoide así como la relación entre ellas y el criterio de selección en una línea paternal de conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron para el estudio 1795 eyaculados de un total de 283 machos adultos pertenecientes a una línea paternal de conejos (línea R) seleccionada por ganancia media diaria (GMD, g/día) durante el periodo de engorde (desde los 28 hasta los 63 días de vida) (Estany et al., 1989). Los machos estaban alojados en 2 núcleos de selección-multiplicación pertenecientes a la red UPV, situados en las provincias de Valencia y Murcia. Los machos fueron sometidos a un ritmo semi-intensivo de recuperaciones (dos eyaculados por semana con un intervalo de tiempo entre recuperaciones de 20 minutos). 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 muestra de 20 µl de semen con 180 µl de glutaraldehído al 0,2%. De cada una de las muestras se analizaron 100 espermatozoides con morfología normal. De cada uno de ellos se tomaron las medidas morfométricas: longitud (L, µm), anchura (W, µm), área (A, µm²) y perímetro (P, µm) de la cabeza del espermatozoide (Marco-Jiménez et al., 2010). Las mediciones se realizaron con la ayuda de Vimas, un software específico para el análisis de la morfometría espermática (IMAGESP, Barcelona, España).

Además se utilizaron 12908 datos de GMD de animales de las 12 generaciones previas de selección. El pedigree incluía un total de 14700 animales.

Se realizaron 6 análisis tricarácter para los caracteres morfométricos y la GMD

El modelo mixto utilizado para los caracteres morfométricos fue el siguiente:

$$y_{sijokl} = \mu_s + S_{si} + O_{sj} + P_{so} + a_{sk} + p_{sk} + c_{sl} + e_{sijokl}$$

donde y_{sijokl} es una medida del carácter s , μ_s es la media general, S_{si} es el efecto sistemático núcleo-año-estación en el que el eyaculado fue recuperado, con 64 niveles, O_{sj} es el efecto sistemático orden del eyaculado con dos niveles (primero o segundo eyaculado), P_{so} es el efecto sistemático de la edad del macho con 3 niveles (≤ 6 meses, 6-8 meses, > 8 meses), a_{sk} es el valor genético aditivo del macho, p_{sk} el efecto aleatorio permanente del macho k sobre todos sus eyaculados, c_{sl} es el efecto aleatorio camada de origen en la cual el macho k ha nacido, y e_{sijokl} es el residual.

El modelo mixto utilizado para la GMD fue el siguiente:

$$y_{dijkl} = \mu_d + b \cdot LS_{di} + YS_{di} + OP_{dj} + a_{dk} + p_{dk} + c_{di} + e_{dijkl}$$

donde y_{dijkl} es la ganancia media diaria del animal k , μ_d es la media general, LS_{di} es la covariable tamaño de camada al nacimiento y b el coeficiente de regresión correspondiente, YS_{di} es el efecto sistemático año estación en el que el animal k fue destetado, con 30 niveles, OP_{dj} es el efecto sistemático orden de parto en el que el animal nació, con 3 niveles (primer, segundo, o superior), a_{dk} es el valor genético aditivo del animal, c_{di} es el efecto

aleatorio camada de origen en la cual el animal k ha nacido. El residual del modelo se ha dividido en dos componentes: p_{dk} el componente que corresponde con la parte residual correlacionada con el efecto aleatorio permanente de los caracteres morfométricos y e_{dijki} que corresponde con la parte residual no correlacionada con ningún otro efecto aleatorio, dentro y entre caracteres.

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 trivariantes se realizaron un total de 2000000 iteraciones con un periodo de quemado de 500000 iteraciones. 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. Los estadísticos de las distribuciones marginales posteriores se calcularon directamente de las muestras guardadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis descriptivos de los caracteres analizados (W: 4.7(0.2); A: 31.9 (1.7); L: 8.5(0.2); P: 23.9 (1.0); media (sd) fueron similares a los obtenidos por otros autores (Marco-Jiménez et al., 2010, Gravance y Davis 1995), observándose que las variables morfométricas presentan un coeficiente de variación pequeño (comprendido entre 2-5%) comparado con otras variables del eyaculado como el volumen o la producción espermática (Lavara et al., 2011; Tusell et al., 2012).

Estos caracteres presentan repetibilidades ligeramente superiores (0.35-0.50, Tabla 1) a las características seminales rutinariamente evaluadas en los centros de inseminación artificial (Brun et al., 2002; García-Tomás et al., 2006; Lavara et al., 2011 y 2012; Tusell et al., 2012). Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que las dimensiones de la cabeza del espermatozoide son heredables (0.20-0.29, Tabla 1), presentando valores superiores a las heredabilidades estimadas en caracteres relacionados con la producción y la calidad seminal (Brun et al., 2009; Lavara et al., 2011 y 2012; Tusell et al., 2012)

Las medias estimadas de las distribuciones marginales posteriores de las correlaciones entre los caracteres morfométricos y entre éstos y el criterio de selección se presentan en la Tabla 2. En relación con el análisis de las correlaciones genéticas entre los caracteres morfométricos cabe destacar que con la excepción de la moderada correlación entre L-W, el resto de correlaciones fueron elevadas y favorables (entre 0.72-0.90, Tabla 2). Por contra las estimas de las correlaciones genéticas entre los caracteres morfométricos y la GMD fueron negativas y en general de magnitud inferior (entre -0.09 y -0.43, Tabla 2), mostrando además un HPD 95% más amplio. Como consecuencia, la selección por ganancia media diaria durante el periodo de engorde podría producir una reducción en las dimensiones de la cabeza del espermatozoide. Este antagonismo ha sido observado a nivel fenotípico por Morrow y Gage (2001) en un experimento en el que los toros seleccionados por caracteres de crecimiento mostraron un tamaño de la cabeza espermática menor que toros seleccionados por producción lechera. En un futuro sería interesante estudiar las relaciones existentes por un lado entre las variables morfométricas y las características seminales, y por otro lado con la fertilidad y prolificidad de las dosis seminales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brun, J.M., Theau-Clement, M. & Bolet, G. 2002. Anim. Res. 51:433-442.
- Brun, J.M., Sanchez, A., Duzert, R., Saleil, G. & Theau-Clément, M. In: *13èmes Journ. Rech. Cunicole*, Le Mans, France. 2009; 11: 17-18.
- Estany, J., Camacho, J., Baselga, M. & Blasco, A. *Genet Sel Evol* 1992; 24: 527-537.
- Gage, M.J.G. 1998. Proc. R. Soc. Lond. B. 265:97-103.
- García-Tomás, M., Sanchez, J., Rafel, O., Ramon, J. & Piles, M. 2006 *Livestock Science* 100:111-120.
- Gravance, C.G. & Davis, R.O. *J Androl* 1995;16:88-93.
- Lavara, R., Vicente, J.S. & Baselga, M. *J Anim Breed Genet* 2011; 12: 44-51.
- Lavara, R., Vicente, J.S. & Baselga, M. *Theriogenology* 2012;78:567-575.
- Legarra, A., Varona, L. & López de Maturana, E. 2008. <http://cat.toulouse.inra.fr/~alegarra>.
- Marco-Jiménez, F., Vicente, J.S., Lavara, R., Balasch, S. & Viudes de Castro, MP. *Reprod Dom Anim* 2010;45:e118-e123.

•Morrow, E.H. & Gage, M.J.G. J Zool Lond 2001;254:147-153 •Tusell, L., Legarra, M., García-Tomás, M., Rafel, O., Ramon, J. & Piles, M. J Anim Sci 2012;90:1385-1397. •Ward, P.I. Heredity 1998;80:655-659.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del proyecto AGL2008-03274 y Prometeo 2009/125. RLavara ha disfrutado una beca FPU (Ministerio de Educación)

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de las distribuciones marginales posteriores de la heredabilidad (h^2), de los efectos permanentes (p^2), de los efectos de camada de origen (c^2) y de la repetibilidad de los caracteres morfométricos

	h^2	p^2	c^2	Repetibilidad
	PM HPD95%	PM HPD95%	PM HPD95%	PM HPD95%
W(μm)	0.28 [0.14, 0.43]	0.09 [0.01, 0.17]	0.12 [0.02, 0.23]	0.48 [0.41, 0.53]
A(μm^2)	0.20 [0.09, 0.31]	0.11 [0.02, 0.19]	0.06 [0.01, 0.13]	0.35 [0.29, 0.42]
L(μm)	0.25 [0.11, 0.39]	0.18 [0.06, 0.30]	0.06 [0.01, 0.13]	0.47 [0.40, 0.53]
P(μm)	0.29 [0.18, 0.41]	0.10 [0.02, 0.17]	0.06 [0.01, 0.13]	0.43 [0.36, 0.49]

PM: media posterior; HPD95%: intervalo de máxima densidad al 95%

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de las distribuciones marginales posteriores de las correlaciones genéticas (r_g), correlaciones entre efectos permanentes (r_p) y entre efectos de camada de origen (r_c) entre los caracteres morfométricos y entre ellos y la ganancia media diaria (GMD)

	r_g	r_p	r_c
	PM HPD95%	PM HPD95%	PM HPD95%
W-A	0.72 [0.42, 0.97]	-0.26 [-1.00, 0.69]	0.45 [-0.63, 1.00]
W-L	0.48 [0.05, 0.94]	0.19 [-0.86, 1.00]	-0.30 [-1.00, 0.66]
W-P	0.87 [0.75, 0.97]	0.59 [-0.46, 1.00]	0.86 [0.56, 1.00]
A-L	0.85 [0.67, 0.97]	0.95 [0.81, 1.00]	0.85 [0.47, 1.00]
A-P	0.90 [0.75, 0.99]	0.55 [-0.43, 1.00]	0.72 [-0.10, 1.00]
L-P	0.80 [0.62, 0.98]	0.90 [0.65, 1.00]	0.17 [-1.00, 0.87]
W-GMD	-0.43 [-0.84, 0.01]	-0.51 [-0.99, 0.11]	-0.09 [-0.58, 0.43]
A-GMD	-0.32 [-0.86, 0.14]	-0.10 [-0.99, 0.68]	0.10 [-0.48, 0.99]
L-GMD	-0.09 [-0.60, 0.42]	-0.35 [-0.99, 0.25]	0.09 [-0.56, 0.99]
P-GMD	-0.34 [-0.74, 0.06]	-0.65 [-0.99, -0.14]	-0.01 [-0.76, 0.81]

PM: media posterior; HPD95%: intervalo de máxima densidad al 95%

GENETIC PARAMETERS OF SPERM MORPHOMETRY IN RABBIT

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the repeatability and heritability of sperm head characteristics: width (W, μm), area (A, μm^2), length (L, μm) and perimeter (P, μm), and to explore the relationships between them and with the selection objective in a rabbit paternal line selected for daily weight gain (DG, g/day) between 28 and 63 days. Six sets of three-trait analyses were performed, involving 12908 records of DG, 1795 ejaculates corresponding to 283 males and 14700 animals in pedigree file. The results obtained showed that sperm head dimensions are heritable (ranged between 0.2 and 0.29). The genetic correlation between sperm traits with the exception of L-W genetic correlation that was moderate, were always high and positive (between 0.72 and 0.90). Regarding the genetic correlations between DG and sperm head characteristics, the resulted means ranged from -0.09 for L-DG to -0.43 for W-DG, showing a consistent evidence of the negativity of the genetic correlations. Further studies should be focused on the relationship between sperm head morphometry and different semen or ejaculate characteristics and also between sperm head morphometry and field fertility and prolificacy.

Keywords: rabbit, daily gain, sperm morphometry, heritability, genetic correlation

¿PUEDEN REALIZARSE EVALUACIONES GENÓMICAS EN PEQUEÑAS POBLACIONES DE SELECCIÓN?

Ibáñez-Escriche*, N. y Sánchez J.P.

IRTA, Genètica i Millora Animal, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida

*Noelia.ibanez@irta.es

INTRODUCCIÓN

La selección genómica (SG) es, actualmente, uno de los principales retos en mejora genética animal. Uno de los aspectos fundamentales para poder aplicar la SG con éxito en una determinada línea genética, es disponer de una población de referencia suficientemente amplia para poder estimar con precisión los valores genómicos de los caracteres de interés. En pequeñas poblaciones de selección, como por ejemplo el porcino ibérico, existe la dificultad de obtener una población de referencia adecuada. Una alternativa interesante para resolver este problema, en este tipo de poblaciones de selección, propuesta por Dekkers (2007), es la utilización conjunta de la información de las líneas "puras" (o estirpes) y sus cruces. Por otra parte, Misztal et al. (2009) propuso un método de evaluación genómica de un solo paso en el cual la matriz de parentesco se aumenta con las contribuciones de la matriz de relaciones genómicas. La principal ventaja de este método es la ponderación automática de la información fenotípica, de parentesco y genómica durante la predicción de los valores genéticos. El objetivo de este trabajo es evaluar, en pequeñas poblaciones de selección, el uso de información genómica proveniente de líneas puras y cruzadas usando el método de evaluación genómica de un solo paso propuesto por Misztal et al. (2009).

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelos y Análisis Estadístico: Los análisis estadísticos se realizaron usando un modelo animal multivariante donde se asumió que los datos de cada línea (A, B y F1) son 3 caracteres correlacionados. Así, $\mathbf{y}' = [\mathbf{y}'_A, \mathbf{y}'_B, \mathbf{y}'_{F1}]$ es

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i \mathbf{b}_i + \mathbf{Z}_i \mathbf{a}_i + \mathbf{e}_i,$$

donde el subíndice i indica los vectores/matrices para la correspondiente composición poblacional ($i=A, B, F1$). Este modelo fue utilizado para realizar cuatro análisis estadísticos diferenciados por el tipo de información genotípica considerada en cada uno de ellos (tabla 1). Los componentes de varianza y los valores genéticos se estimaron y predijeron usando REML, considerando como matriz de covarianza entre los individuos la matriz \mathbf{H} (Legarra, et al., 2009) que combina la matriz genómica y la matriz de relaciones de parentesco aditivo. La matriz genómica se construyó siguiendo la definición de VanRaden (2008), $\mathbf{G} = \mathbf{Z}\mathbf{Z}'/2\sum \mathbf{p}_i(1 - \mathbf{p}_i)$, \mathbf{Z} se define como $\mathbf{M} - \mathbf{P}$, donde \mathbf{M} es la matriz de los alelos de los marcadores codificándolos como el número de copias que tiene un SNP de un alelo, que en este caso puede ser 0, 1, ó 2 y \mathbf{P} es igual a dos veces la frecuencia alélica de cada locus. En la construcción de la matriz genómica se asumieron dos situaciones en relación a las frecuencia alélicas a considerar, 1) la estima de frecuencia alélica del segundo alelo (freqmix) de las poblaciones combinadas y 2) una frecuencia constante de 0.5 (freq0.5) para todos los loci.

Simulación: Se consideraron dos situaciones diferentes, con similar estructura. En la primera se asumió que las poblaciones A y B provenían de un origen común ($N_e=100$), pero estaban separadas por 500 generaciones de apareamiento aleatorio. En la segunda situación se consideraron poblaciones con orígenes diferentes pero con el mismo tamaño efectivo ($N_e=100$). En todas las simulaciones se utilizó una distribución *gamma* para muestrear los efectos de los QTL bialélicos, y una distribución *de Bernoulli* con frecuencia 0,5 para sus alelos. En todas las generaciones simuladas la tasa de mutación considerada fue de 0,000025 y la distribución de los puntos de recombinación a lo largo del genoma fue

modelada usando una función binomial de mapeo. Los fenotipos considerados en el análisis incluyeron las 3 primeras generaciones de las poblaciones A, B (200 individuos por población y generación) y la población F1 (1200 individuos) resultante de cruzar la 3ª generación de las poblaciones A y B. La genealogía incluyó 800 individuos de las poblaciones A y B (4 generaciones) y 1200 individuos de la F1. Para la generación de estos fenotipos se asumieron 100 QTLs segregando y una heredabilidad de 0.3 en la F1. La información genotípica se obtuvo a partir de 3000 marcadores SNP distribuidos en un genoma de 200 cM y formado por dos cromosomas. Durante los análisis únicamente se incluyeron los genotipos de 600 animales, pero la composición de esta información genotípica varió dependiendo del escenario a considerar (tabla1). La validación de los distintos escenarios se hizo considerando la precisión y el sesgo de los GEBVs. Para ello se calcularon la correlación y el error cuadrático entre el verdadero valor genético y el predicho para los animales de la cuarta generación de la línea A.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las tablas 2 y 3 muestran, respectivamente, las medias y los errores estándar obtenidos con 25 réplicas para la correlación y el error cuadrático (EC), considerados como una medida de precisión y de sesgo, entre el valor verdadero y el estimado. Los resultados obtenidos muestran un aumento de correlación y una disminución de EC de las predicciones de los valores genéticos de los animales genotipados cuando se tiene en cuenta la información de los marcadores. Sin embargo, en las evaluaciones genéticas que utilizaron información genotípica, no se observaron diferencias apreciables de correlación. Este no es el caso del EC, ya que claramente la evaluación genética que combinó información de marcadores de las poblaciones A y B y su cruce (F1) fue la que obtuvo el menor valor. En relación a las frecuencias alélicas consideradas para construir la matriz **G** no se encontraron diferencias en términos de precisión ni de sesgo, estos resultados coinciden con los obtenidos por Simeone et al. (2012) con datos reales de pollos donde se combina la información genotípica, de parentesco y fenotípica de dos líneas diferentes. Entre las dos situaciones consideradas las diferencias fueron pequeñas, únicamente señalar una ligera reducción de la correlación, acompañada también de una reducción del EC, en la situación 2, cuando las líneas tienen un origen independiente. Adicionalmente, los análisis con información genómica mostraron una sobreestimación de las varianzas aditivas (resultados no mostrados) lo que coincide con lo encontrado por otros autores (Forni, et al., 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que es posible combinar información genómica de cruzados y de las líneas de que proceden, para mejorar los resultados de la SG en poblaciones pequeñas. No obstante, es necesario un estudio más profundo sobre la construcción de la matriz **G** teniendo en cuenta, en este tipo de evaluaciones genómicas, las frecuencias alélicas de cada población para poder mejorar así la precisión y reducir el sesgo de las varianzas genéticas y los valores genéticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dekkers J.C.M 2007. J. Anim. Sci., 85, 2104-2114.
- Forni S., Aguilar I., Misztal I 2011. Genet Sel Evol. 43(1): 1.
- Legarra A., Aguilar I., Misztal I. 2009. J. Dairy Sci., 92, 4656-4663
- Misztal I., Legarra A., Aguilar I. 2009 J. Dairy Sci., 92,4648-4655.
- Simeone et al. 2012. J. Anim. Breed. Genet. 129 3-10
- Van Raden P.M. 2008. J. Dairy Sci., 91, 4414-4423.

Agradecimientos: A José Luis Noguera por su inestimable aportación de ideas y su ayuda en la revisión y elaboración de este trabajo.

Tabla 1. Distribución del número de animales genotipados en función de la población y de la evaluación genética.

Evaluación	Población		
	A	B	F1

genética*			
C	-	-	-
GAB	400 (100 por generación)	400 (100 por generación)	-
GF1	100 (4ª generación)	100 (4ª generación)	600
GABF1	200 (1ª-3ª generación)	200 (1ª-3ª generación)	200
	100 (4ª generación)	100 (4ª generación)	

C: Evaluación genética sin datos de genotipos; GABC: Evaluación genética con datos de genotipos de la líneas puras; GF1: Evaluación genética con datos de genotipos de la F1 y de la población de validación; GABF1: Evaluación genética con datos de genotipos de las líneas puras y de la F1.

Tabla 2. Media y error estándar de la correlación, para 25 réplicas, entre los valores genéticos estimados y verdaderos de la población de validación genotipada A.

Situación		C*	GABC*	GF1*	GABF1*
1	Freqmix	0.54 (0.02)	0.69 (0.02)	0.71 (0.02)	0.72 (0.01)
	Freq0.5	0.54 (0.02)	0.69(0.01)	0.70 (0.01)	0.71 (0.01)
2	Freqmix	0.50 (0.02)	0.68 (0.02)	0.67 (0.02)	0.70 (0.01)
	Freq0.5	0.50 (0.02)	0.68 (0.02)	0.67 (0.02)	0.70 (0.01)

*C: Evaluación genética sin datos de genotipos; GABC: Evaluación genética con datos de genotipos de la líneas puras; GF1: Evaluación genética con datos de genotipos de la F1 y de la población de validación; GABF1: Evaluación genética con datos de genotipos de las líneas puras y de la F1.

Tabla 3. Media y error estándar del error cuadrático, para 25 réplicas, entre los valores genéticos estimados y verdaderos de la población de validación genotipada A.

Situación		C*	GABC*	GF1*	GABF1*
1	Freqmix	0.78 (0.13)	0.73 (0.14)	0.75 (0.08)	0.45 (0.06)
	Freq0.5	0.78 (0.13)	0.71 (0.14)	0.75 (0.08)	0.40 (0.06)
2	Freqmix	0.70 (0.09)	0.61 (0.10)	0.68 (0.11)	0.35 (0.03)
	Freq0.5	0.70 (0.09)	0.62 (0.10)	0.68 (0.11)	0.39 (0.04)

*C: Evaluación genética sin datos de genotipos; GABC: Evaluación genética con datos de genotipos de la líneas puras; GF1: Evaluación genética con datos de genotipos de la F1 y de la población de validación; GABF1: Evaluación genética con datos de genotipos de las líneas puras y de la F1.

¿COULD BE THE SINGLE STEP GENOMIC EVALUATION USED IN SMALL POPULATIONS OF SELECTION?

ABSTRACT: The aim of this study is to evaluate under simulation the use of genomic information from purebred and crossbred lines using the Genomic Evaluation Single Step method in small populations of selection. Two scenarios with two purebred lines (A and B) and a F1 cross were simulated: 1) two purebred lines have a common origin but they are 500 generations apart and 2) two breeds without common origin. Trait phenotypic values controlled by 100 segregating QTL and with a heritability of 0.30 were simulated for the F1 individuals. Further, 3000 segregating markers on two chromosomes of 1 Morgan were chosen for analysis. The same amount of phenotypes (600 A, 600 B, 1200 F1), pedigree (800 A, 800 B, 1200 F1) and genotypes (600) data were used in all genomic evaluations. However, three different combinations of genotypes were used: only purebred, only F1 and a mixing of purebred and F1 individuals, respectively. Results did not showed a decrease of accuracy when the F1 genotype information was incorporated in genomic evaluation. Moreover, the smallest quadratic error was obtained when purebreds and F1 genotypes combination were used. These results would strengthen of using genotype crossbred information to genomic evaluate small populations with the Single Step method.

Keywords: Genomic selection, Crossbred data, Single Step approach, Small populations of selection

EFFECTO DEL MODO DE DIVERGENCIA EVOLUTIVA EN LA PRECISIÓN DE LA SELECCIÓN GENÓMICA EN POBLACIONES MÚLTIPLES

Mouresan, E. F., González, A., Moreno, C., Altarriba, J., Varona, L.

Unidad de Genética Cuantitativa y Mejora Animal. Universidad de Zaragoza. 50013.

Zaragoza

e.f.mouresan@hotmail.com

INTRODUCCION

La selección genómica (Meuwissen et al., 2001) es un procedimiento de selección asistida por marcadores que estima los efectos asociados a éstos en una población de aprendizaje para predecir el mérito genético de los futuros candidatos a la selección. La precisión de la selección genómica depende del grado de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y las mutaciones causales de la variabilidad genética, así como de la cantidad de información fenotípica disponible para estimar los efectos asociados a los marcadores (Hayes et al., 2009). En vacuno de leche, la eficiencia de la selección genómica para incrementar la respuesta a la selección ha sido claramente demostrada (Hayes et al., 2009). Este hecho se produce gracias a la existencia de una población de referencia internacional y al uso extensivo de la inseminación artificial.

Sin embargo, la eficiencia en vacuno de carne es más cuestionable, debido a que existen poblaciones de tamaño reducido. La ausencia de una población de referencia de suficiente magnitud impide obtener estimadores de alta precisión (Seidel, 2009) en población única. Por lo tanto, la evaluación a partir de información procedente de varias poblaciones puede ser de gran utilidad. Sin embargo, la heterogeneidad de origen e historia evolutiva de las poblaciones, genera variabilidad entre ellas en cuanto a la determinación genética para los caracteres de interés zootécnico y los patrones de desequilibrio de ligamiento (de Roos et al., 2009). Como consecuencia, las estimaciones obtenidas de los efectos asociados a los marcadores en una población no son directamente extrapolables de una población a otra (Harris et al., 2008).

El objetivo de este trabajo es comparar la precisión de los valores mejorantes predichos, utilizando información fenotípica de varias poblaciones y metapoblaciones en la estimación de los efectos asociados a los marcadores, bajo distintos escenarios de densidad de marcadores, generaciones de divergencia y causas del aislamiento reproductivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se simuló una población base de 100 individuos (50 machos y 50 hembras). Para cada uno de ellos se simularon 30000 marcadores dialélicos localizados uniformemente a lo largo de 20 cromosomas de 1 Morgan cada uno. De estos marcadores, se seleccionaron 100 de ellos al azar para cada uno de los dos caracteres simulados y se les atribuyó un efecto aditivo obtenido por muestreo al azar de una distribución $N(0,1)$. Además, se simuló una tasa de mutación de 6.6×10^{-4} , con el objetivo de mantener la variabilidad genética. Los individuos fundadores se aparearon aleatoriamente durante 1,000 generaciones. La transmisión de la información genética se realizó mediante *gene dropping*. A partir de este momento, la población se subdividió en 4 poblaciones, también de 100 individuos cada una de ellas. En ellas, se simularon valores fenotípicos para los dos caracteres asumiendo heredabilidades 0.2 y 0.4. Las poblaciones A y B fueron sometidas a un proceso de selección fenotípica para cada uno de los dos caracteres durante 50 generaciones. Además, las poblaciones C y D se mantuvieron bajo apareamiento aleatorio también durante 50 generaciones. El proceso de obtención de estas poblaciones se ilustra en la Figura 1.

En la 50ª generación las poblaciones se expandieron a 2,000 individuos cada una de ellas y se realizó una evaluación genómica mediante el software GS3 (Legarra et al., 2012), tomando como poblaciones de entrenamiento 11 posibles alternativas, las cuatro poblaciones puras (A,B,C y D) y 7 poblaciones compuestas (A+B, A+C, A+D, B+C, B+D, C+D, A+B+C+D) con igual porcentaje de cada una de las poblaciones de origen. Para la evaluación, se utilizaron los modelos Bayes-CPi (Habier et al., 2011) y GBLUP (Meuwissen et al., 2001). Se asumieron distribuciones uniformes para las varianzas y para π , donde π es la probabilidad de que un marcador tenga efecto. Se analizó mediante McMC a partir de una cadena de 100,000 iteraciones después de descartar las 20,000 primeras.

A partir de la estimación de los efectos asociados a los marcadores en las poblaciones de aprendizaje, se obtuvo la predicción de los valores mejorantes de los candidatos a la selección en todas las poblaciones. La precisión se estimó mediante la correlación entre los valores predichos y simulados de los valores mejorantes de los candidatos a la selección

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de precisión de los valores mejorantes predichos en las poblaciones puras y para el carácter 1 mediante BayesCPi se presentan en la Tabla 1. En ella se observa que la capacidad predictiva es superior en las poblaciones que no han sufrido un proceso de selección reciente (C y D) y en las que han sido seleccionadas para otro carácter (B), que en la población en la cual el carácter de interés ha sido objeto de selección (A). Este resultado se debe a la disminución de la variabilidad genética en la población seleccionada y la fijación de una mayor proporción de algunos de los genes causales de la variabilidad genética. Por otra parte, se constata que entre poblaciones separadas durante 50 generaciones, la capacidad predictiva de una población a otra es baja. Los resultados utilizando GBLUP fueron equivalentes aunque con una precisión inferior.

Cuando se utilizaron bases de datos de entrenamiento compuestas por individuos de dos poblaciones, la precisión de la evaluación para los individuos de las poblaciones implicadas fue en torno a 0.35 y muy inferior para las poblaciones no implicadas en la base de datos de entrenamiento (Tabla 2). Finalmente, cuando se utilizó una base de datos de entrenamiento compuesta por individuos de todas las poblaciones, los resultados obtenidos fueron mejores que a partir de 2 poblaciones para todas las poblaciones implicadas (desde 0.380 a 0.513).

Los resultados para el carácter 2, con heredabilidad 0.40, fueron equivalentes, aunque, como era esperable, la precisión fue de mayor magnitud (resultados no mostrados). En estos momentos se está trabajando en la ejecución de varias réplicas del experimento de simulación para obtener resultados de mayor precisión y calcular el grado de incertidumbre de los mismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- de Roos, A. P. W., Hayes, B. J., Goddard, M. E. 2009. *Genetics* 183: 1545-1553.
- Habier, D., Fernando, R., Kizilkaya, K., Garrick, D., 2011. *BMC Bioinformatics* 12, 186.
- Harris, B. L., Johnson, D. L., Spelman, R.J. 2008. *Proc. ICAR 36th Session*, pp. 325-330.
- Hayes, B., Bowman, P., Chamberlain, A., Verbyla, K., Goddard, M. 2009. *Genetics Selection Evolution* 41, 51.
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., Goddard, M. E. 2009. *J. Dairy Sci.* 92, 433-443.
- Legarra, A., Ricard, A., Filangi, O. 2012. <http://snp.toulouse.inra.fr/~alegarra/>
- Meuwissen, T. H. E., Hayes, B. J., Goddard, M. E. 2001. *Genetics* 157, 1819-1829.
- Seider, G. E., Jr. 2009. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 138-144.

Tabla 1. Precisión de los valores mejorantes predichos en población pura para el carácter 1.

Poblaciones de aprendizaje				
Validación	A	B	C	D
A	0.629	0.091	0.124	0.074
B	0.016	0.690	0.075	0.275
C	0.161	0.096	0.689	0.172
D	0.114	0.086	0.059	0.725

Tabla 2. Precisión de los valores mejorantes predichos en poblaciones compuestas para el carácter 1.

Poblaciones de aprendizaje							
Validación	A+B	A+C	A+D	B+C	B+D	C+D	A+B+C+D
A	0.312	0.276	0.319	0.049	0.037	0.027	0.380
B	0.289	0.056	0.043	0.383	0.351	0.052	0.513
C	0.015	0.331	0.054	0.318	0.052	0.314	0.392
D	0.106	0.037	0.386	0.103	0.346	0.360	0.453

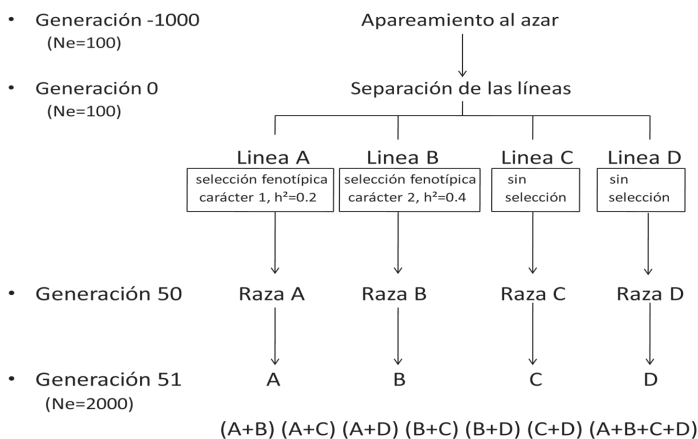


Figura 1. Representación esquemática de las poblaciones simuladas.

THE EFFECT OF THE TYPE OF THE EVOLUTIONARY DIVERGENCE ON THE ACCURACY OF GENOMIC SELECTION IN MULTIPLE POPULATIONS

ABSTRACT: In beef cattle, the small size of the population of each breed does not allow us to have a training set of sufficient size as to achieve high accuracies of genomic selection, and the evaluations in one breed do not apply to others. Using admixed populations for training might give a solution to these problems. The results of this study show that training in purebred populations gives good accuracies when validating in the same population, although slightly lower when the population is under selection for the trait of interest. Training in admixed populations gives higher accuracies for the breeds that participate in the training set than for the ones that do not, but these accuracies are significantly lower than those obtained from training in purebred population. Finally, when the training set is made of all 4 breeds, the accuracies are slightly better for all breeds than those obtained with the 2-breed admixed population.

Keywords: genomic selection, multiple populations

SELECCIÓN GENÓMICA EN EL GANADO VACUNO DE LECHE ESPAÑOL

Jiménez-Montero, J.A.^{1*}, González-Recio, O.² y Alenda, R.¹

¹Departamento de Producción Animal. ETSI Agrónomos. UPM Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid. ²INIA. *Correo electrónico: joseantonio.jimenez.montero@upm.es

INTRODUCCIÓN

La selección genómica está cambiando profundamente los programas de mejora genética y el mercado del vacuno de leche. En la actualidad, es posible obtener mayor precisión en las valoraciones genéticas de animales muy jóvenes sin la necesidad del fenotipo propio o el de sus hijas. En este trabajo se estudian de las bases para la implementación de un programa de selección genómica en el vacuno de leche. Para ello se realizaron estudios de simulación y valoraciones genómicas con datos reales de la primera población nacional de referencia.

El objetivo principal fue contribuir a la implementación de la selección genómica en el vacuno de leche español. Los objetivos específicos fueron: (1) Estudiar alternativas de genotipado en poblaciones reducidas de vacuno lechero. (2) Desarrollar y validar metodología para la evaluación de grandes cantidades de genotipos. (3) Estudiar el efecto de los procesos de imputación de genotipos en la capacidad predictiva de los genotipos resultantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

La población de referencia española estaba formada por algo más de 1,600 toros con prueba de progenie, tamaño insuficiente para obtener predicciones genómicas competitivas. Por tanto, debían evaluarse diferentes alternativas para incrementar la capacidad predictiva de las evaluaciones. Se realizó un estudio de simulación comparando estrategias de genotipado selectivo en poblaciones de hembras frente a la selección tradicional o selección genómica con una población de referencia de machos.

Posteriormente, la entrada en Eurogenomics implica el acceso a una población de referencia de más de 22,000 toros y por tanto posibilita evaluaciones con la fiabilidad necesaria, pero es necesario desarrollar una metodología capaz de analizar grandes bases de datos. Los algoritmos de Machine Learning son una buena alternativa para este tipo de problemas. Se desarrolló el algoritmo Random Boosting (**R-Boost**), que realiza de forma secuencial un muestreo aleatorio de SNP's en cada iteración sobre los cuales se aplica un predictor débil.

La población de referencia española fue usada para comparar el R-Boost frente a Bayes-A, LASSO Bayesiano y G-BLUP en términos de precisión y sesgo.

Es posible optimizar el coste de genotipado mediante la imputación de genotipos a una mayor densidad previamente a su evaluación. Se evaluó el efecto de usar genotipos de baja densidad imputados con el software *Beagle* en cuanto a su posterior habilidad predictiva. Para ello se emplearon dos métodos de evaluación R-Boost y un G-BLUP. Animales de los que se conocían los SNP's incluidos en los chips GoldenGate Bovine 3K (**3K**) y BovineLD BeadChip (**6K**), fueron imputados hasta conocer los SNP's incluidos en el BovineSNP50v2 BeadChip (**50K**). Posteriormente, un segundo proceso de imputación obtuvo los SNP's incluidos en el BovineHD BeadChip (**HD**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estrategias que consisten en usar como población de referencia los animales en los extremos de la distribución fenotípica obtuvieron las mejores predicciones (Figura 1). Los resultados usando 1,000 genotipos fueron 0.50 para el carácter de baja heredabilidad y 0.63 para el de heredabilidad media cuando la variable dependiente fue el fenotipo ajustado. Cuando se usaron valores genéticos como variable dependiente las correlaciones fueron 0.48 y 0.63 respectivamente. En comparación, una población de 996 machos obtuvo correlaciones de 0.48 y 0.55 en las predicciones posteriores (Jiménez-Montero et al., 2012). Las predicciones genómicas fueron más precisas que el índice de pedigrí tradicional a la hora de predecir los resultados de futuros test de progenie como era de esperar (Tabla 1). Las ganancias en precisión debidas al empleo de la selección genómica dependen del carácter evaluado y variaron entre 0.04 (Profundidad de ubre) y 0.42 (Porcentaje de grasa) unidades de correlación de Pearson. Los resultados promediados entre caracteres mostraron que el LASSO Bayesiano obtuvo mayores correlaciones superando al R-Boost, Bayes-A y G-BLUP en 0.01, 0.03 y 0.03 unidades respectivamente. Las predicciones

obtenidas con el LASSO Bayesiano también mostraron menos desviaciones en la media, 0.02, 0.03 y 0.10 menos que Bayes-A, R-Boost y G-BLUP, respectivamente. Las predicciones usando R-Boost obtuvieron coeficientes de regresión más próximos a la unidad que el resto de métodos y los errores cuadráticos medios fueron un 2%, 10% y 12% inferiores a los obtenidos a partir del B-LASSO, Bayes-A y G-BLUP, respectivamente (González-Recio et al., 2013; Jiménez-Montero et al., 2013).

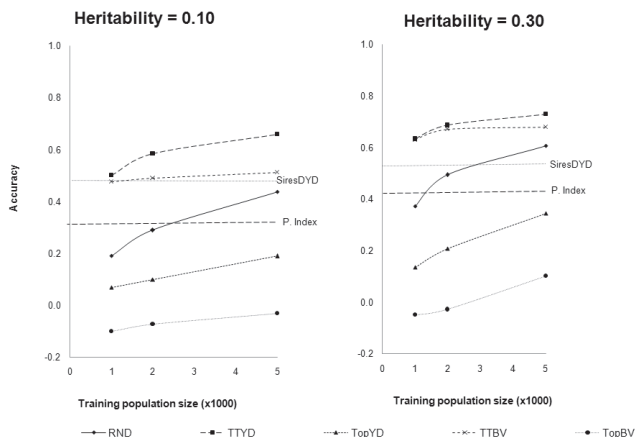


Figura 1. Precisiones estimadas para dos caracteres de heredabilidad 0.10 y 0.30 obtenidas en poblaciones de validación a partir de poblaciones de referencia de 1000, 2000 y 5000 hembras. Las estrategias de genotipado fueron: al azar (RND), mejores fenotipos (TopYD), mejores valores genéticos (TopBV), extremas en fenotipo (TTYD), extremas en valor genético (TTBV), 996 toros (SiresDYD) e índice de pedigrí tradicional.

Tabla 1. Precisión, coeficientes de regresión y error cuadrático medio (MSE) de las predicciones genómicas para cuatro metodologías de evaluación y cinco caracteres de interés económico en el vacuno lechero español.

Método	Leche (MY)	Grasa (FY)	Proteína (PY)	% de Grasa (FP)	Prof. Ubre (UD)
Precisión					
Sire-PI	0.37	0.37	0.40	0.39	0.51
B- LASSO	0.60	0.61	0.57	0.74	0.55
Bayes-A	0.55	0.61	0.55	0.65	0.56
R-Boost	0.54	0.60	0.50	0.81	0.54
G-BLUP	0.58	0.59	0.57	0.62	0.55
Coefficientes de regresión					
B- LASSO	0.73	0.80	0.70	1.06	0.63
Bayes-A	0.58	0.78	0.67	0.79	0.69
R-Boost	0.87	0.99	0.80	1.19	0.82
G- BLUP	0.71	0.80	0.70	1.02	0.64
MSE					
B- LASSO	239992	398	206	0.03	0.95
Bayes-A	289122	404	215	0.04	0.90
R-Boost	247593	395	216	0.03	0.92
G- BLUP	269619	423	219	0.04	0.95

En negrita: Método que obtiene los mejores resultados para cada criterio considerado.

Tras imputar desde 3K y 6K, se obtuvo similar capacidad predictiva a la obtenida empleando los originales en densidad 50K (Tabla 2). Sin embargo, al imputar a HD se obtuvo una pequeña mejora en la selección de individuos (Jiménez-Montero et al., Enviado).

Tabla 2. Ratio de animales correctamente clasificados de acuerdo a su ranking, conteniendo cada clase el 20% de los animales. Resultados para genotipos imputados a 50K y HD (700K) a partir de densidades 3K , 6K y 50K.

	3K50K	6K50K	50K50K	3KHD	6KHD	50KHD
Leche (MY)	0.33	0.32	0.34	0.34	0.32	0.34
% Grasa (FP)	0.43	0.43	0.45	0.44	0.43	0.46
Células somáticas (SCC)	0.32	0.33	0.34	0.32	0.35	0.32
Días Abiertos (DO)	0.22	0.26	0.23	0.22	0.25	0.27

En negrita: Genotipado con un mayor número de animales correctamente clasificados.

CONCLUSIONES

La estrategia de genotipado de hembras que proporciona la mayor correlación es la que incluye las hembras de ambas colas de la distribución de fenotipos. Mientras que la mera inclusión de las hembras élite que son las habitualmente genotipadas en las poblaciones reales produce resultados no satisfactorios en la predicción de valores genómicos.

El R-Boost es una metodología aplicable a selección genómica y competitiva en términos de capacidad predictiva.

El genotipado a baja densidad y la posterior imputación a 50K obtiene permite tomar decisiones de selección apropiadas reduciendo el coste de genotipado. Además, la capacidad predictiva para algunos caracteres puede mejorar imputando la población de referencia a HD si se emplean métodos de evaluación capaces de adaptarse a las distintas arquitecturas genéticas posibles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jimenez-Montero, J.A., González-Recio, O., Alenda, R. 2012. *Animal*. 6:1216-1224.
- Jimenez-Montero, J.A., González-Recio, O., Alenda, R. 2013. *J. Dairy Sci.* 96:625-634.
- González-Recio, O., Jimenez-Montero, J.A., Alenda, R. 2013. *J. Dairy Sci.* 96:614-624
- Jimenez-Montero, J.A., Gianola, D., Weigel, K., Alenda, R., González-Recio, O. (submitted *J. Dairy Sci.*).

Agradecimientos: Conafe, Aberekin, Ascol, Genetycal, Xenetica Fontao, CDTI-P080250866 UPM, INIA-CC10-046, MAGRAMA. LCV Algete.

GENOMIC SELECTION IN SPANISH DAIRY CATTLE

ABSTRACT: This study includes initial stages for the implementation of genomic selection program in the Spanish Holstein population and has been used to obtain the official genomic breeding values and implement the imputation of genotypes. The objectives were: (1) To study alternative genotyping strategies for small populations, (2) to develop and validate methods for the evaluation of large data sets of genotypes, and (3) to study the effect of imputation process in predictive ability.

The most informative strategy involved genotyping of females that exhibited upper and lower extreme values when compared with traditional pedigree index and a bull reference population. Including just top animals resulted in poor results.

R-Boost resulted a competitive marker regression methodology in terms of predictive ability when compared with Bayes-A, Bayesian LASSO and G-BLUP. Optimization of the algorithm and behavior of tuning parameters were tested over real dairy cattle data reducing the time used with the original algorithm with negligible differences in accuracy and bias.

Customized GoldenGate Bovine 3K and BovineLD BeadChip genotypes imputed to a BovineSNP50v2 BeadChip using *Beagle* achieved similar predictive ability than native genotypes. Subsequently, imputing to the BovineHD BeadChip and utilizing proper methods genomic predictions may be improved.

Keywords: Genomic Selection, Dairy Cattle, Imputation

PREDICCIÓN GENÓMICA MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN SEMI-PARAMÉTRICA EN VACUNO LECHERO

S. T. Rodríguez-Ramilo^{1,3}, J. A. Jiménez-Montero² y Ó. González-Recio³

¹CONAFE. Ctra. de Andalucía, Km. 23,6. 28340, Madrid

²Dpto. de Producción Animal. ETSI Agrónomos. UPM. 28040, Madrid

³Dpto. de Mejora Genética Animal. INIA. Ctra. La Coruña Km. 7,5. 28040, Madrid

E-mail: rodriguez.silvia@inia.es

INTRODUCCIÓN

La selección simultánea en función de miles de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) está siendo una alternativa para incrementar la ganancia genética en vacuno lechero. Los valores genómicos directos pueden ser estimados reemplazando la matriz tradicional de relaciones de pedigrí por la matriz de relaciones genómicas (VanRaden, 2008; Yang et al., 2010). Generalmente, se emplea una población de referencia para predecir los valores mejorantes en los nuevos candidatos a la selección (Hayes et al., 2009).

Existen distintas metodologías para llevar a cabo predicciones genómicas (e. g. Meuwissen et al., 2001; de los Campos et al., 2009). Dentro de los algoritmos de aprendizaje automático se engloban los métodos no paramétricos o semi-paramétricos, los cuales se pueden implementar mediante regresiones sobre los marcadores (González-Recio et al., 2010) o mediante la construcción de estructuras de (co)varianza apropiadas. Un ejemplo de estas últimas metodologías es la Regresión de espacios de Hilbert con núcleo reproductor (RKHS de sus siglas en inglés), la cual se ha sugerido como una alternativa para la predicción de valores genómicos, ya que requiere menos asunciones a la hora de modelar caracteres cuantitativos complejos (Gianola y van Kaam, 2008). En este trabajo se propone la utilización de la metodología RKHS empleando como estructura de kernels la matriz de relaciones genómicas para realizar predicciones genómicas en siete caracteres evaluados en vacuno lechero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos

Los 18446 toros de la población de EuroGenomics fueron genotipados con el Bovine 50K chip (Illumina inc., San Diego), aunque algunos machos de la población holandesa fueron genotipados con el CRV 60K chip y posteriormente imputados. Se descartaron los SNPs con un porcentaje de datos faltantes por encima del 5% y con una frecuencia alélica menor de 5%. Por tanto, el análisis se realizó con 36971 SNPs.

Los machos nacidos antes del 2005 ($N = 14487$) fueron empleados como población de referencia (R) y los nacidos con posterioridad al año 2005 ($N = 3959$) se usaron como población de validación (V) para evaluar la habilidad predictiva del algoritmo. Como datos fenotípicos se emplearon las pruebas deregresadas de tres caracteres de producción: kilos de leche (KL), kilos de grasa (KG), y kilos de proteína (KP); dos caracteres de tipo: estatura (EST) y anchura de pecho (ANPE); recuento de células somáticas (RCS) y días abiertos (DA). Las pruebas deregresadas de la población de referencia y de la población de validación fueron las de enero del 2009 y diciembre del 2011, respectivamente.

Modelo

La aproximación semi-paramétrica RKHS permite inferir valores genómicos mejorantes sin realizar estrictas asunciones a priori. En el contexto de la selección genómica (Gianola y van Kaam, 2008; González-Recio et al., 2008) el modelo se puede formular como sigue:

$$y = X\beta + K\alpha + e$$

donde \mathbf{y} (14487×1) es la prueba deregresada de los machos en la población de referencia. El primer término ($\mathbf{X}\boldsymbol{\beta}$) es el término paramétrico con $\boldsymbol{\beta}$ como vector de efectos sistemáticos (solamente μ se ajustó en este caso porque los datos fueron precorregidos), y \mathbf{X} es la matriz de incidencias. El término no paramétrico viene dado por $\mathbf{K}\boldsymbol{\alpha}$, donde \mathbf{K} es una matriz definida positiva de kernels, y $\boldsymbol{\alpha}$ es un vector de coeficientes no paramétricos que se asume que siguen una distribución $\boldsymbol{\alpha} \sim N(0, \mathbf{K}^{-1}\sigma_{\alpha}^2)$, donde σ_{α}^2 representa la inversa del parámetro de sintonización ($\sigma_{\alpha}^2 = \lambda^{-1}$). Los residuos \mathbf{e} se distribuyen como $N(0, \mathbf{R} = \mathbf{N}^{-1}\sigma_e^2)$ donde $\mathbf{N} = \{n_i\}$ es la diagonal de la matriz donde n_i es el número de descendientes del macho i y σ_e^2 es la varianza residual. Se realizó un análisis Bayesiano del modelo implementado a través del algoritmo de muestreo de Gibbs.

Matriz de kernels

La idea que subyace en cualquier matriz de kernels es medir la distancia que existe entre los genotipos de los distintos individuos (González-Recio et al., 2009). En este estudio se implementa como distancia la matriz de relaciones genómicas (VanRaden, 2008; Yang et al., 2010). La relación genómica (G_{ij}) entre los individuos i y j se calcula como:

$$G_{ij} = \frac{1}{L} \sum_{k=1}^L \frac{(g_{ik} - \hat{p}_k)(g_{jk} - \hat{p}_k)}{\hat{p}_k(1 - \hat{p}_k)}$$

donde g_{ik} se refiere a las frecuencias génicas del valor de los genotipos AA , Aa y aa , codificado como 1, 1/2 y 0, respectivamente, para el individuo i en el locus k , donde $i = 1, N$ y $k = 1, L$ (número de loci). La frecuencia génica es la mitad del número de copias del alelo de referencia A . La estima de la frecuencia alélica para el locus k en la población actual se designa como \hat{p}_k .

Estimación de ratios de varianza y valores genómicos directos (VGD)

A partir de distintos tamaños muestrales de la población de referencia ($N = 4992, 6981, 10957$ y 14487) se obtuvieron los ratios de la varianza genómica y residual. Los valores genómicos directos de cada carácter se calcularon para cada individuo de la población de validación de la siguiente forma:

$$\text{VGD} = \mu + \mathbf{G}_{\text{V,R}} \times \boldsymbol{\alpha}$$

Criterios de comparación

La precisión de las predicciones genómicas se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r), pendiente de regresión (b) y el error cuadrático medio (ECM) entre los VGD predichos en los toros de la población de validación y las pruebas deregresadas de diciembre del 2011. También se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson entre el índice de pedigri (IP) y las pruebas deregresadas de diciembre del 2011.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra los ratios de la varianza genómica y residual para los siete caracteres evaluados en distintos tamaños de muestra de la población de referencia. Las estimas son más elevadas en los caracteres de tipo, seguidos estos de los caracteres de producción y finalmente RCS y DA. En general, a medida que se incrementa el tamaño de muestra el

ratio se reduce, llegando a ser inferior a la heredabilidad real. Este descenso es más acusado en los caracteres de tipo y producción que en RCS y DA. Consecuentemente, las predicciones genómicas se llevaron a cabo empleando las varianzas obtenidas a partir de $N = 4992$.

En la Tabla 1 se muestra el coeficiente de correlación de Pearson, la pendiente de la recta de regresión y el error cuadrático medio entre los VGD y las pruebas deregresadas. También se muestra la correlación entre el IP y las pruebas deregresadas. En todos los caracteres evaluados (excepto en DA) la correlación con IP fue menor que la correlación con los VGD. Los caracteres EST y DA mostraron la mayor (0,78) y menor (0,49) correlación con los VGD, respectivamente. Por el contrario, la mayor pendiente de la recta de regresión se detectó en DA (1,02) y la menor en EST (0,81). El error cuadrático medio varió entre 176002,20 (KL) y 0,51 (EST).

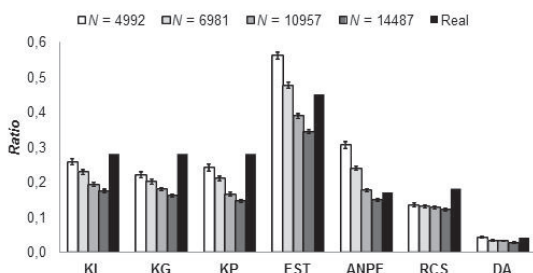


Figura 1. Estima de los ratios entre varianza genómica y residual en los caracteres evaluados en distintos tamaños de muestra (N) de la población de referencia. Real: heredabilidad real.

Tabla 1. Coeficiente de correlación de Pearson, pendiente de la recta de regresión, error cuadrático medio y correlación con el índice de pedigrí en los caracteres evaluados.

Carácter	r	b	ECM	IP
KL	0,74	0,94	176002,20	0,54
KG	0,71	0,90	299,55	0,51
KP	0,69	0,91	205,87	0,54
EST	0,78	0,81	0,51	0,61
ANPE	0,64	0,87	1,36	0,58
RCS	0,70	0,94	93,74	0,55
DA	0,49	1,02	382,92	0,53

En resumen, los resultados indican que la aproximación semi-paramétrica RKHS permite inferir valores genómicos mejorantes en distintos caracteres en vacuno lechero de forma adecuada cuando se emplea la matriz de relaciones genómicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de los Campos, G., Naya, H., Gianola, D., Crossa, J., Legarra, A., Manfredi, E., Weigel, K.A. & Cotes, J.M. 2009. *Genetics* 182:375-385.
- Gianola, D. & van Kaam, J.B.C.H.M. 2008. *Genetics* 178:2289-2303.
- González-Recio, O., Gianola, D., Long, N., Weigel, K.A., Rosa, G.J.M. & Avendaño, S. 2008. *Genetics* 178:2305-2313.
- González-Recio, O., Gianola, D., Rosa, G.J.M., Weigel, K.A. & Kranis, A. 2009. *Genet. Sel. Evol.* 41:3.
- González-Recio, O., Weigel, K.A., Gianola, D., Naya, H. & Rosa, G.J.M. 2010. *Genet. Res. (Camb.)* 92:227-237.
- Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.C., Verbyla, K. & Goddard, M.E. 2009. *Genet. Sel. Evol.* 41:51.
- Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J. & Goddard, M.E. 2001. *Genetics* 157:1819-1829.
- VanRaden, P.M. 2008. *J. Dairy Sci.* 91:4414-4423.
- Yang, J., Benyamin, B., McEvoy, B.P., Gordon, S., Henders, A.K., Nyholt, D.R., Madden, P.A., Heath, A.C., Martin, N.G., Montgomery, G.W., Goddard, M.E., Visscher, P.M. 2010. *Nat. Genet.* 42:565-569.

SEMI-PARAMETRIC APPROACH FOR GENOME WIDE PREDICTION IN DAIRY CATTLE

ABSTRACT: This study aims to implement a semi-parametric approach in dairy cattle within the context of genome-wide prediction. The Reproducing Kernel Hilbert Spaces Regression model with the genomic matrix as kernel seems to perform properly when inferring direct genomic values in seven phenotypic traits.

Keywords: Reproducing Kernel Hilbert Spaces Regression, non-parametric methods, genome-assisted prediction.

EVALUACIÓN GENÉTICA (QUE NO GENÓMICA) MEDIANTE BOOSTING

Casellas, J.

Grup de Recerca en Remugants. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. joaquim.casellas@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Desde que se derivaron los modelos BLUP (*best linear unbiased prediction*) a mediados del siglo pasado (Henderson 1950), esta herramienta analítica se erigió como la piedra filosofal de la mejora genética animal durante décadas. Los modelos BLUP se centran en la predicción del mérito (o demérito) genético del ganado para los caracteres productivos evaluados, corrigiendo también para otros efectos sistemáticos y aleatorios. Aunque la precisión de los valores genéticos se incrementa sustancialmente al incorporar información genómica a los modelos de evaluación (Meuwissen *et al.* 2001), los modelos BLUP clásicos aún resultan esenciales en la mayoría de los esquemas de selección donde el genotipado masivo excede, de largo, el presupuesto disponible. Es por ello que resulta especialmente relevante la posibilidad de evaluar alternativas metodológicas al BLUP, con el objetivo de incrementar la precisión de los valores genéticos obtenidos a partir únicamente de la información fenotípica y genealógica.

El algoritmo de *boosting* ha sido recientemente propuesto como una alternativa no paramétrica en el campo de la selección genómica (González-Recio *et al.* 2010), proporcionando precisiones elevadas e incluso sesgos menores. No obstante, su utilidad dentro del ámbito de la evaluación genética (que no genómica) nunca ha sido evaluada. Es por ello que el objetivo principal de este trabajo fue adaptar el algoritmo de *boosting* a un marco de evaluación genética de reproductores, comparando sus resultados con los obtenidos mediante un modelo mixto lineal estándar.

MATERIAL Y MÉTODOS

El *boosting* es una técnica de aprendizaje automático propuesta por Schapire (1990) y Freund (1990); combina predictores moderadamente imprecisos (conocidos como *weak learners*) con el objetivo de generar una norma de predicción con mayor habilidad de predicción que cualquiera de los *weak learners* por separado. Este tipo de aproximaciones fueron desarrolladas originariamente para problemas de clasificación (Freund 1990; Schapire 1990), aunque pronto se generalizaron a los algoritmos de regresión (Friedman 2001), y recientemente realizaron las primeras incursiones en el campo de la mejora genética animal (Bühlmann 2006; González-Recio *et al.* 2010).

Este trabajo se centra en el algoritmo L_2 -*boosting* (Freund & Schapire 1996), el cual evalúa el grado de incorrección de las predicciones a partir de la diferencia cuadrática media entre los datos reales y predichos. Además, se propone el siguiente *weak learner*,

$$y_j = \beta_i a_{ij} + e_j$$

donde y_j es el registro fenotípico del individuo j (pre-correctado para las demás fuentes ambientales de variación), β_i es el coeficiente de regresión inherente al mérito genético del individuo i , a_{ij} representa el coeficiente de parentesco aditivo entre los individuos i y j , y e_j corresponde al residuo. Para una base de datos con s individuos, n de los cuales disponiendo de información fenotípica, el L_2 -*boosting* se basa en tres pasos sucesivos que se repiten de manera iterativa hasta alcanzar un determinado criterio de convergencia. Durante el primer paso, el *weak learner* se aplica a cada individuo por separado, proporcionando coeficientes de regresión específicos para cada uno de ellos. El segundo paso requiere de la computación de residuos aplicando la fórmula

$$r_i = \mathbf{y} - \sum_{j=1, n} [v(\beta_i a_{ij})],$$

asumiendo que \mathbf{r}_i es el vector de residuos al aplicar el *weak learner* sobre el individuo i , \mathbf{y} es el vector de fenotipos resultantes después de las correcciones efectuadas en las iteraciones previas (ver el tercer y último paso del procedimiento), y v es un parámetro de contracción fijado a 0,01 en el caso que nos ocupa. El cuadrado medio del error (CME) para el i -ésimo coeficiente de regresión se obtiene de la siguiente expresión,

$$CME_i = \sum_{j=1, n} r_i^2$$

y caracteriza el ajuste del *weak learner* para el individuo i . Este paso proporciona un total de s estimas de CME, distintas, evaluando la contribución de cada individuo incluido en la genealogía. El tercer y último paso implica la selección del individuo que minimiza el CME (asumiendo que es el individuo k), y los datos fenotípicos de actualizan aplicando $\mathbf{y} = \mathbf{r}_k$.

Para evaluar el comportamiento predictivo del L_2 -*boosting* se simularon poblaciones de 2.000 individuos con 10 generaciones no solapadas de 10 machos y 190 hembras bajo apareamiento aleatorio. Se simuló un registro fenotípico para todos los individuos, incluyendo la influencia de dos efectos fijos (2 y 10 niveles respectivamente; efectos obtenidos de una distribución uniforme entre -1 y 1) y el efecto genético aditivo aunque bajo tres escenarios distintos ($h^2=0,1, 0,2$ y $0,4$; $\sigma_e^2=1$). Dado que la convergencia del procedimiento se evaluó mediante validación cruzada, se seleccionó un 10% de los individuos nacidos en las últimas cinco generaciones y la población se subdividió en el set de entrenamiento (90%) y el de ajuste (10%). El procedimiento de L_2 -*boosting* se aplicaba sobre el set de entrenamiento, mientras que el CME se calculaba en el set de ajuste al final de cada iteración. El algoritmo finalizaba cuando la reducción en el CME después de cada iteración era inferior a 10^{-5} .

Los resultados se compararon con los obtenidos bajo un modelo BLUP estándar resuelto mediante inferencia Bayesiana. En este caso, se realizó el análisis descartando el fenotipo del 10% de individuos seleccionados en las últimas 5 generaciones, y se calculó el CME resultante sobre el set de ajuste al finalizar el análisis. En ambos casos se calculó también la diferencia cuadrática media entre los valores genéticos simulados y predichos para los individuos del set de ajuste. En total se realizaron 10 réplicas para cada escenario de heredabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las propiedades de predicción del L_2 -*boosting* se resumen en las figuras 1 y 2 de este trabajo; a pesar que se restringen a las réplicas con $h^2=0,1$ por limitaciones de espacio, los demás escenarios siguieron comportamientos muy parecidos. Aunque, en promedio, el CME alcanzó valores ligeramente inferiores para el L_2 -*boosting* ($1,133 \pm 0,035$) que para el BLUP clásico ($1,128 \pm 0,034$), no se observó una patrón constante en la figura 1, sugiriéndose que ambas aproximaciones se comportaban de manera muy parecida y que las ligeras ventajas obtenidas se debían muy probablemente al azar. De manera parecida, la diferencia cuadrática media entre los valores mejorantes simulados y predichos fue muy similar bajo ambas aproximaciones y sin mostrar una tendencia clara a favor de una o la otra.

En conclusión, el L_2 -*boosting* se sugiere como una alternativa interesante a los modelos BLUP para la evaluación genética cuando existen individuos sin información fenotípica; esta situación se da en la mayoría de sistemas productivos ganaderos al tener que seleccionar la reposición antes incluso de que aporten sus primeras producciones (p.ej., prolificidad en cerdas y conejas, producción de leche en rumiantes, calidad de la carne). En cualquier caso, representa un punto de partida muy interesante para el futuro desarrollo y evaluación de otros *weak learners*, con el objetivo de mejorar esta aproximación no paramétrica que, ya inicialmente, aporta una habilidad de predicción comparable a la de los modelos BLUP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bühlmann, P. 2006. Ann. Stat. 34: 559-583
- Freund, Y. 1990. Proc. 3th Ann. Workshop Comput. Learning Theory, Rochester, NY, 202-216
- Freund, Y. & Schapire, R. E. 1996. Proc. 13th Int. Conf. Machine Learning, San Francisco, CA, 148-156
- Friedman, J. H. 2001. Ann. Stat. 29: 1189-1232
- González-Recio, O., Weigel, K. A., Gianola, D., Naya, H. & Rosa, G. J. M. 2010. Genet. Res. 92: 227-237
- Henderson, C. R. 1950. Ann. Math. Statist. 28: 276-290
- Meuwissen, T. H. E., Hayes, B. J. & Goddard, M. E. 2001. Genetics 157: 1819-1829
- Schapire, R. 1990. Mach. Learn. 5: 197-227

Agradecimientos: Esta investigación se enmarca dentro del proyecto AGL2010-21176/GAN financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad; el contrato de J. Casellas se vincula al programa "Ramon y Cajal" (RYC-2009-04049).

Figura 1. Cuadrado medio del error para el 10% de individuos asignados al set de ajuste (su fenotipo no contribuye al análisis) y obtenido mediante BLUP clásico (barras blancas) o boosting (barras negras).

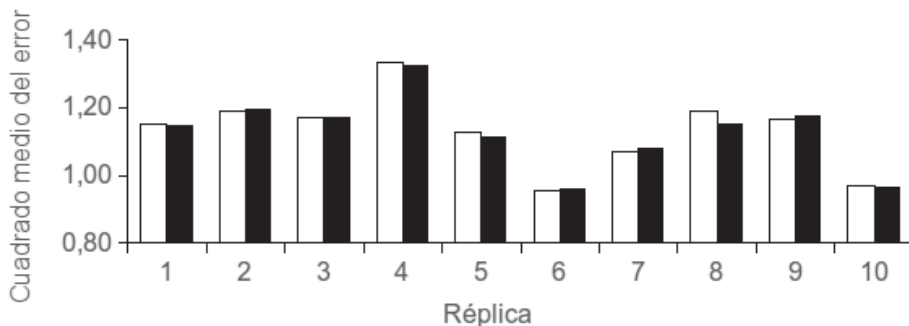
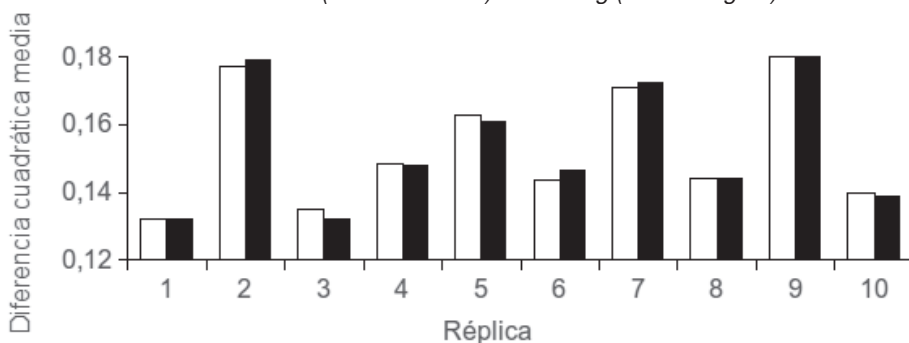


Figura 2. Diferencia cuadrática media entre los valores mejorantes simulados y predichos para el 10% de individuos asignados al set de ajuste (su fenotipo no contribuye al análisis) y obtenido mediante BLUP clásico (barras blancas) o boosting (barras negras).



GENETIC EVALUATION BY BOOSTING

ABSTRACT: This research focuses on the adaptation of the boosting algorithm to perform genetic evaluation of livestock populations. Boosting combines rough and moderately inaccurate predictors known as “weak learners” into a prediction rule with potentially greater predictive ability than that of any of the individual weak learners. This approach was evaluated on simulated data sets and compared with mixed linear animal models solved through a standard Bayesian approach. Prediction abilities of both boosting and BLUP approaches were similar, without a clear pattern favoring one or the other method. In a similar way, mean square differences between simulated and predicted breeding values were almost equal, and slight advantages were randomly obtained by the boosting or the BLUP approach depending on the analyzed data set. This suggested that boosting must be viewed as an appealing alternative when selection decisions must be taken on individuals without phenotypic data.

Keywords: artificial intelligence, accuracy, boosting, genetic evaluation

LA IMPRONTA GENÓMICA PATERNA Y LOS MODELOS CON EFECTOS MATERNOS

González-Rodríguez¹, A., Mouresan¹, E.F., Altarriba¹, J., Díaz², C., Meneses², C., Moreno¹, C., Varona¹, L.

¹Unidad de Genética Cuantitativa y Mejora Animal. Universidad de Zaragoza. 50013.

²Departamento de Mejora Genética Animal. INIA.28080.Madrid

E-mail: aldemarango69@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Los objetivos a la selección en vacuno de carne incluyen caracteres cuya expresión contiene una componente materna por lo cual, para la evaluación genética de dichos caracteres se utilizan modelos animales (Henderson, 1984) con efectos genéticos y/o ambientales maternos (Willham, 1972; Meyer, 1992). Sin embargo, dichos efectos pueden ser confundidos con efectos asociados a la impronta genética (Hager, et al., 2008), que puede ser de origen paterno y materno. La impronta genética es un fenómeno dependiente del sexo del progenitor, que actúa a través de una expresión diferencial de la información genética según su origen y puede generar sesgos en la estimación de componentes de (co)varianza cuando falta alguno de los componentes en el modelo utilizado, como demuestran Varona et al., (2012) con datos simulados. En este trabajo se estudia el posible efecto de la impronta en la estimación de parámetros genéticos en tres poblaciones de vacuno de carne Pirenaica, Avileña-Negra Ibérica y Rubia Gallega que posee características distintas con sistemas de producción diversos. Para ello se hacen diversos supuestos en los modelos de estimación que incluyen efectos genéticos directos, paternos y maternos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo, se han utilizado 17.106 pesos al destete correspondientes a la población Pirenaica (PI), 41.248 a la Avileña-Negra Ibérica (ANI) y 55.631 a la Rubia Gallega (RG). En la Tabla 1 se presenta un resumen de las medias y desviaciones típicas fenotípicas. Por otra parte, se utilizó un fichero genealógico de 34.418, 60.136 y 80.166 para PI, ANI and RG, respectivamente.

Los datos fueron analizados mediante los siguientes modelos:

$$y = Xb + Th + Fa + Zu_{\alpha} + \varepsilon \text{ (D)}$$

$$y = Xb + Th + Fa + Zu_{\alpha} + Z^p u_p + \varepsilon \text{ (DP)}$$

$$y = Xb + Th + Fa + Zu_{\alpha} + Z^m u_m + \varepsilon \text{ (DM)}$$

$$y = Xb + Th + Fa + Z^p u_p + Z^m u_m + \varepsilon \text{ (PM)}$$

$$y = Xb + Th + Fa + Zu_{\alpha} + Z^p u_p + Z^m u_m + \varepsilon \text{ (DPM)}$$

Donde **b** corresponde a los efectos sistemáticos sexo (2 niveles), edad de la madre (19 niveles en RG y 6 niveles en ANI), suplementación con tolva (3 niveles en ANI) y una covariable de edad al destete en todas las poblaciones; como efectos aleatorios esta **h** rebaño-año-estación (RAE) (2782, 3347 y 8655 niveles para PI, ANI and RG, respectivamente) y α para ambiente permanente materno; u_{α} es el efecto genético aditivo directo, u_p es el efecto genético aditivo paterno, u_m es el efecto genético aditivo materno y **e** el efecto residual; **X**, **T**, **F**, **Z**, **Z^p** y **Z^m** son las matrices de incidencia. Los modelos **DP**, **DM** y **PM** se implementaron incluyendo correlación genética entre los efectos genéticos incluidos en el modelo y asumiendo independencia entre ellos (**DPnull**, **DMnull** y **PMnull**, respectivamente). El modelo **DPM** asumió independencia entre los efectos.

Se realizó un análisis bayesiano mediante muestreo de Gibbs, utilizando el programa TM (Legarra et al., 2008) y una versión modificada del mismo para eliminar la estimación de la covarianza entre efectos genéticos. Se asumieron distribuciones planas para los efectos sistemáticos y los componentes de varianza, y una distribución normal multivariada para los efectos aleatorios. Se simuló una única de cadena de 525.000 elementos, de las cuales se descartaron los primeros 25.000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los componentes de (co)varianza estimados en las poblaciones PI, ANI y RG se presentan en las tablas 2, 3 y 4, respectivamente. En términos generales se observa una importante presencia de efectos paternos en los modelos en los que son incluidos (**DP**, **DPnull**, **PM**, **PMnull** y **DPM**), y siempre de una mayor magnitud que los efectos maternos e incluso directos. En los modelos que no incluyen estos efectos paternos (**DM**) se observa una sobreestimación de los efectos directos y maternos y la aparición de una fuerte covarianza negativa entre efectos directos y maternos, confirmando los resultados presentados por Varona et al. (2012), mediante simulación estocástica. Es destacable que en modelos que no asumen esta covarianza (**DMnull**), la magnitud de las varianzas directas y maternas se reduce.

Estos resultados sugieren la posible presencia de impronta genética paterna en los caracteres de crecimiento de vacuno de carne y puede explicar la presencia de una correlación genética negativa entre efectos directos y maternos, habitual en el análisis de datos de vacuno de carne. Estos resultados conducen a la necesidad de plantear nuevos modelos que incluyan el efecto de la impronta genética para disponer de estimas insesgadas de los componentes de varianza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Henderson, C.R., 1984. University of Guelph. Guelph, Ontario, Canada.
- Willham, R.L., 1972. J. Anim. Sci. 35:1288-1293.
- Meyer, K., 1992. Livest. Prod. Sci. 31:179.
- Hager, R., Cheverud J.M., Wolf J.B., 2008. Genetics 178:1755-1762.
- Varona, L., Casellas, J., Moreno C., Altarriba, J., 2012. EAAP-63rd Annual Meeting, Bratislava. Session 42:305.

TABLA 1. Medias y desviaciones típicas observadas en el carácter peso al destete.

POBLACIÓN	No DATOS	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
PIRENAICA	17.106	264,22	56,66
AVILEÑA	41.248	216,74	41,23
RUBIA GALLEGA	55.631	276,31	45,92

TABLA 2. Media posterior (desviación típica) de los componentes estimados en la PI.

Parámetros	Modelos							
	D	DP	DP null	DM	DM null	PM	PM null	DPM
$\sigma_{u_1}^2$	821,78 (49,6)	511,23 (63,22)	493,11 (58,31)	1391,93 (97,92)	759,7 (51,26)	-	-	340,48 (60,44)
$\sigma_{u_2}^2$	-	555,62 (63,92)	525,73 (52,33)	-	-	630,89 (53,57)	641,69 (52,78)	536,39 (57,5)
$\sigma_{u_3}^2$	-	-	-	440,63 (52,12)	115,15 (19,36)	173,06 (22,46)	171,42 (22,71)	102,34 (28,64)
$\sigma_{\sigma_{u_1}^2 \sigma_{u_2}^2}$	-	-45,845 (50,03)	-	-	-	-	-	-
$\sigma_{\sigma_{u_1}^2 \sigma_{u_3}^2}$	-	-	-	-595,19 (66,24)	-	-	-	-
$\sigma_{\sigma_{u_2}^2 \sigma_{u_3}^2}$	-	-	-	-	-	147,74 (30,29)	-	-
$\sigma_{\sigma_{u_1}^2 \sigma_{u_2}^2 \sigma_{u_3}^2}$	545,09 (24,93)	449,66 (22,45)	449,03 (22,37)	497,71 (23,73)	527,96 (24,64)	444,52 (22,29)	446,83 (22,38)	444,62 (22,32)
$\sigma_{\sigma_{u_1}^2 \sigma_{u_2}^2}$	107,68 (18,27)	99,93 (18,95)	102,99 (18,54)	71,12 (19,2)	48,09 (16,25)	68,91 (19,35)	67,001 (19,51)	60,05 (20,47)
$\sigma_{\sigma_{u_1}^2 \sigma_{u_3}^2}$	796,86 (31,52)	944,68 (37,69)	953,88 (35,67)	513,75 (51,46)	816,91 (32,35)	1195,63 (19,52)	1195,84 (19,42)	1027,15 (37,85)

$\sigma_{u_1}^2$ (Varianza genética), $\sigma_{u_2}^2$ (covarianza), $\sigma_{u_3}^2$ (Directo), $\sigma_{u_4}^2$ (Paterno), $\sigma_{u_5}^2$ (Materno), $\sigma_{u_6}^2$ (Varianza ambiental), $\sigma_{u_7}^2$ (RAE), $\sigma_{u_8}^2$ (ambiente materno) $\sigma_{u_9}^2$ (Varianza residual), null (covarianzas fijadas a cero).

TABLA 3. Media posterior (desviación típica) de los componentes estimados en la ANI.

Parámetros	Modelos							
	D	DP	DP null	DM	DM null	PM	PM null	DPM
$\sigma_{u_d}^2$	181,25 (11,48)	124,69 (13,31)	117,72 (12,32)	483,13 (30,94)	167,33 (11,49)	-	-	63,09 (16,12)
$\sigma_{u_{dp}}^2$	-	251,64 (24,5)	233,75 (21,4)	-	-	252,69 (21,36)	253,25 (20,83)	240,21 (20,79)
$\sigma_{u_{dm}}^2$	-	-	-	170,72 (14,78)	36,79 (5,68)	48,07 (5,05)	48,21 (4,72)	33,07 (5,8)
$\sigma_{u_{dp}}^2 \sigma_{u_{dm}}^2$	-	-27,02 (15,25)	-	-	-	-	-	-
$\sigma_{u_{dp}}^2 \sigma_{u_{dm}}^2$	-	-	-	-239,46 (19,05)	-	-	-	-
$\sigma_{u_{dpm}}^2$	-	-	-	-	-	20,604 (9,28)	-	-
$\sigma_{p_h}^2$	454,83 (14,25)	351,81 (11,8)	350,97 (11,75)	397,33 (12,87)	447,1 (14,16)	350,59 (11,77)	351,07 (11,72)	350,15 (11,74)
$\sigma_{p_a}^2$	83,68 (4,34)	81,04 (4,56)	82,27 (4,52)	66,09 (5,5)	60,39 (5,31)	68,33 (5,15)	68,32 (5,07)	68,58 (4,89)
σ_a^2	435,65 (7,4)	461,24 (8,24)	464,78 (7,83)	285,64 (15,8)	441,03 (7,52)	522,51 (4,76)	522,33 (4,78)	490,96 (9,27)

$\sigma_{u_d}^2$ (Varianza genética), $\sigma_{u_{dp}}^2$ (covarianza), $\sigma_{u_{dm}}^2$ (Directo), $\sigma_{u_{dpm}}^2$ (Paterno), $\sigma_{u_{dm}}^2$ (Materno), $\sigma_{u_{dp}}^2$ (Varianza ambiental), h^2 (RAE), $\sigma_{u_{dpm}}^2$ (ambiente materno) σ_a^2 (Varianza residual), **null** (covarianzas fijadas a cero).

TABLA 4. Media posterior (desviación típica) de los componentes estimados en la RG.

Parámetros	Modelos							
	D	DP	DP null	DM	DM null	PM	PM null	DPM
$\sigma_{u_d}^2$	416,09 (24,67)	279,47 (30,59)	284,94 (30,88)	778,27 (61,76)	381,99 (26,38)	-	-	223,41 (38,87)
$\sigma_{u_{dp}}^2$	-	244,47 (42,52)	264,91 (33,71)	-	-	322,8 (29,02)	343,84 (27,49)	249,1 (26,97)
$\sigma_{u_{dm}}^2$	-	-	-	203,17 (31,21)	37,5 (8,63)	117,81 (11,13)	112,48 (11,17)	54,06 (10,05)
$\sigma_{u_{dp}}^2 \sigma_{u_{dm}}^2$	-	20,96 (26,46)	-	-	-	-	-	-
$\sigma_{u_{dp}}^2 \sigma_{u_{dm}}^2$	-	-	-	-295,36 (39,68)	-	-	-	-
$\sigma_{u_{dpm}}^2$	-	-	-	-	-	140,7 (15,997)	-	-
$\sigma_{p_h}^2$	339,21 (9,14)	327,76 (8,87)	327,22 (8,87)	331,07 (9,06)	333,74 (9,19)	321,45 (8,86)	321,21 (8,89)	320,54 (8,43)
$\sigma_{p_a}^2$	88,2 (7,48)	99,43 (7,68)	98,58 (7,71)	78,69 (8,55)	68,36 (7,56)	67,65 (8,32)	71,42 (8,75)	75,16 (7,09)
σ_a^2	799,19 (14,55)	866,23 (17,4)	863,46 (17,49)	618,95 (31,27)	815,39 (15,52)	1002,88 (8,13)	1002,28 (8,09)	892,23 (21,34)

$\sigma_{u_d}^2$ (Varianza genética), $\sigma_{u_{dp}}^2$ (covarianza), $\sigma_{u_{dm}}^2$ (Directo), $\sigma_{u_{dpm}}^2$ (Paterno), $\sigma_{u_{dm}}^2$ (Materno), $\sigma_{u_{dp}}^2$ (Varianza ambiental), h^2 (RAE), $\sigma_{u_{dpm}}^2$ (ambiente materno) σ_a^2 (Varianza residual), **null** (covarianzas fijadas a cero).

PATERNAL GENOMIC IMPRINTING AND MODELS WITH MATERNAL EFFECTS

ABSTRACT: The results here presented suggest an important presence of paternal effects that may be explained under sire imprinted effects. Moreover, models that do not consider paternal effects report a relevant overestimation of genetic variances and a strong negative correlation between direct and maternal genetic effects. These phenomena can be explained as a consequence of the redistribution of the paternal variance over the effects included in the model of analysis.

Keywords: Beef cattle, Imprinting, Maternal effects, Weaning Weight.

CNV: CONSIDERANDO NUEVAS VARIANTES EN EL GENOMA

Ben Sassi¹, N., Fernández, A.I., González-Recio O.

¹Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid.

e-mail: naila.bensassi@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las variantes estructurales denominadas 'Copy Number Variants' (CNV) corresponden a deleciones o duplicaciones de segmento del DNA que ocupan 1Kb o más de longitud del genoma. Estudios recientes muestran que estos polimorfismos originan variabilidad genética y podrían ser responsables de una parte de la variabilidad fenotípica de caracteres relevantes tanto en la especie humana como en especies ganaderas (Girirajan *et al.*, 2011; Clop *et al.*, 2012). A pesar de que varios trabajos han identificado cientos de CNVs en vacuno (Bickhart *et al.*, 2012), pocos son los trabajos que los han asociados a caracteres productivos en esta especie (Kramper, 2012).

El objetivo del presente trabajo fue identificar CNVs asociados a los principales caracteres productivos de la raza bovina Holstein mediante el análisis de la señal de hibridación de las sondas del chip de genotipado masivo de SNPs BovineSNP50BeadChip (Illumina).

MATERIALES Y METODOS

Se usaron datos correspondientes a 1900 toros en la raza Holstein cedidos por la Confederación de Asociaciones de Frisona Española (CONAFE) con los cuales se realizó el genotipado masivo de SNPs con el chip bovineSNP50BeadChip (Illumina).

Detección de CNVs: La detección de los CNVs se realizó utilizando el programa PennCNV (Wang, 2008), siguiendo la anotación *UMD3.1* del genoma bovino (cromosoma y posición de los SNPs). Previamente al análisis de detección de CNVs, se llevó a cabo una corrección por el contenido en bases GCs de la región así como un filtrado por la calidad de las muestras basado en las medidas de intensidad de señal de las hibridaciones. Un total de 1724 individuos pasaron el control de calidad. Finalmente, la identificación de CNVs se realizó mediante la opción individual CNV-call de PennCNV. Aquellos CNVs solapantes fueron ensamblados en regiones CNV (CNVRs). Estas regiones fueron filtradas según los siguientes criterios: i) contener 3 o más SNPs consecutivos y ii) ser detectados en un mínimo número de individuos.

Análisis de asociación: Los análisis de asociación se realizaron sobre aquellos toros (1195) que disponían de datos fenotípicos, utilizando como variables dependientes las pruebas MACE de-regresadas de diciembre de 2011 para los caracteres de kilogramos de proteína (PR), kilogramos de grasa (GR), recuento de células somáticas (RCS) y días abiertos (DA). Se utilizaron dos metodologías de análisis: i) regresión lineal estándar empleando el programa PLINK y corrección por múltiples test (FDR<0.05) de Benjamini-Hochberg (Wang *et al.*, 2008), ii) análisis bayesiano definiendo dos modelos: lineal y cuadrático. El modelo cuadrático se empleó con el fin de testar asociaciones no lineales entre el carácter y la región CNV. Los CNVs que tras un test de permutación, permitían rechazar la hipótesis nula (no asociación), fueron seleccionados como candidatos al análisis *in-silico*.

Para explorar el contenido de genes en las CNVRs que mostraron asociación con los caracteres analizados se utilizaron las herramientas BioMart de Ensembl (ensembl.org/biomart) y las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov/) para explorar la función biológica de los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 2022 CNVRs fueron detectados en los 1724 individuos analizados. El tamaño de estas regiones varió desde 30,128 Kb a 17,165 Mb con un tamaño medio de 616,132 Kb. El porcentaje total del genoma ocupado por CNVR fue del 52,19%. De éstos, se seleccionaron aquellos CNVRs que mostraron una frecuencia superior al 5‰ en los 1195 individuos con datos fenotípicos, que correspondió a un total de 315 CNVRs que fueron finalmente testados en el análisis de asociación, siendo 28 inserciones, 15 deleciones y 269 inserción-delección (mismo CNVR presenta inserción y delección en distintos individuos). Las frecuencias oscilaron entre 5‰ y 53%.

Los resultados de los análisis de asociación se resumen en la tabla 1. Estos resultados revelan asociaciones significativas para los cuatro caracteres analizados. Los resultados más consistentes fueron en los CNV800 y 779 detectados en ambos GR y PR. Ambos CNVRs resultaron significativos con ambos métodos lineales tanto para PR como para GR. El que se hayan identificado CNVRs asociados a ambos caracteres es coherente, dado que existe una alta correlación positiva entre la cantidad de grasa y proteína en la leche.

Tabla 1: CNVs significativos y sus respectivas estimas de los coeficientes según el análisis en el que resultasen significativos. Se muestra además el porcentaje de duplicaciones y deleciones observados en la muestra utilizada

Car	CNV	RLS		Bayes Lineal		Bayes cuadrático	% Dup	% Del
		$\beta \pm SE$	P-value*	α	β	β_2		
GR	778	5,8 \pm 1,4	6,0x10 ⁻⁴	1,7	-7,2	-	14,8	11,1
	800	4,6 \pm 0,9	5,6x10 ⁻³	0,4	-5,8	-	29,7	23,1
	739	-	-	-0,9	-15,1	6,9	24,4	22,7
PR	778	6,8 \pm 1,2	1,1x10 ⁻⁵	3,2	-8,5	-	14,8	11,1
	800	4,6 \pm 0,8	2,0x10 ⁻⁵	0,5	-5,7	-	29,7	23,1
	427	-	-	16,6	-38,3	15,5	3,0	1,5
	446	-	-	5,3	-20,6	7,9	10,2	11,8
	739	-	-	-1,3	-13,9	6,6	24,4	22,7
	1192	-	-	1,1	-16,5	7,2	18,0	16,0
	1358	-	-	-1,0	-14,5	7,4	20,0	13,2
	1511	-	-	-211,7	307,9	-101,8	0,16	0,75
	1644	-	-	-0,8	-13,7	6,5	21,8	15,7
	RCS	82	-	-	123,5	31,4	-30,2	0,1
861		-	-	121,7	19,5	-15,8	0,7	1,1
879		-	-	116,8	30,2	-22,3	0,2	0,4
1200		-	-	131,5	-12,9	5,4	7,2	3,6
1675		-	-	119,9	22,0	-17,1	0,3	0,4

* P-value corregido (FDR<0.05), RLS: Regresión Lineal Estándar, GR: Kg de grasa; PR: Kg de proteína; RCS: Recuento de células somáticas; DA: Días abiertos; RSL: regresión lineal estándar; Dup: Duplicación; Del: Delección

La anotación de los genes contenidos en los CNVRs asociados (Tabla 2) permite identificar genes funcionalmente relacionados con los caracteres analizados y por tanto constituyen potenciales genes causales. Entre estos destaca el gen de la *hormona de crecimiento (GH)* localizado en el CNV800, previamente asociado con cantidad de proteína y grasa en la leche en ganado bovino Holstein-Frisona (Mullen *et al.*, 2010), y el gen *Low density lipoprotein-related protein 1B LRP1B* localizado en el CNV861, que ha sido asociado al carácter recuento de células somáticas (Cole *et al.*, 2011). Según nuestros resultados, los individuos con delección en las regiones CNV 778 y 800 producirían más kg de grasa y proteína que la media. Los CNVRs detectados proporcionan un mayor conocimiento de las regiones genómicas asociadas a caracteres de interés en Holstein, y podrían ser útiles en las evaluaciones genómicas de reproductores. Estas utilidades serán objeto de futuros estudios.

Tabla 2: Genes potencialmente relacionados con los caracteres encontrados en los CNVs significativos

Carácter	ID_CNVR (nº genes contenidos)	Gen relacionado
RCS	82(0), 861(1), 879(0), 1200(132), 1675(2)	<i>LRP1B</i>
GR	800(495), 778(7)	<i>GH, SREBF, STAT5, ACLY, TNFR, WF1KKN1</i>
	739(132)	-
PR	800(495), 778(7)	<i>GH</i>
	76(70), 80(96), 739(132), 1192(2), 1358(360), 1511(7), 1644(161)	<i>DGAT1, IGFAL, GFER, PPARA, CPT1B</i>

DA: Días abiertos, RCS: Recuento de células somáticas; GR: kg de grasa; PR: kg de proteína

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• Bickhart D., Hou Y., Schroeder S., Alkan C. *et al.* 2012 *Genome Research* 22(4):778–790 • Clop A., Vidal O., Amilís M., 2012 *Anim Genet* 43(5) • Cole J., Wiggans G., Ma L., *et al.* 2011 *BMC Genomics* 12:408 • Girirajan S., Rosenfeld J.A., Coe B.P. *et al.* 2012 *N Engl J Med* 367 • Kramper T., 2012 Tesis Doctoral • Mullen M.P., Lynch C.O., Waters S.M. *et al.* 2011 *GMR* 10: 1819-1830 • Wang K., Chen Z., Tadesse M.G. *et al.* 2008 *Nucleic Acids Research* 36(21).

Agradecimientos: Los autores agradecen a CONAFE, Aberekin S.A., Ascol, Genetecale, Xenetica Fontao, MAGRAMA, LCV Algete por su colaboración en el proyecto. Neila Ben Sassi disfruta de una beca de Master del CIHEAM, y agradece a CONAFE el pago de la inscripción a las jornadas.

CNV: CONSIDERING NEW VARIANTS IN THE GENOME

Abstract: The objective of this study was to identify copy number variants associated to economical traits (fat and protein yield, somatic cell count and days open) in Holstein. CNVs were detected by exploiting hybridization signal intensities from the BovineSNP50BeadChip and using PennCNV software. More than 2000 CNVRs were identified, 315 thereof appeared segregating in the sires with available phenotypic data. Frequentist and Bayesian approaches were used in the association analyses. Both fat and protein yield shared associated CNVRs. We may highlight *GH*, *SREB*, *STAT5*, *TNRF* and *ACLY* among the genes located within these regions, which have been previously associated to fat yield in different studies. Further, five different genes (*DGAT1*, *IGFAL*, *GFER*, *PPARA*, *CPT1B*) were detected and previously reported as related to both protein and fat yield pathways in Holstein. Additionally, we reported that six different CNVRs are significantly associated with somatic cell count and among the genes contained within these regions, the *LRP1B*, have been already related to the trait.

Keywords: CNV, association analyses, Holstein.

INFLUENCIA DE LA LACTACIÓN SOBRE EL EMBRIÓN: ¿EPIGENÉTICA O EFECTO MATERNO?

González-Recio, O.^{1*}, Ugarte, E.², Bach, A.³

¹Departamento de Mejora Genética Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ctra. La Coruña km 7,5. 28040 Madrid.

²NEIKER-TECNALIA. Campus Agroalimentario de Arkaute. Apdo 46 E-1080 Vitoria-Gasteiz, Araba.

³ICREA, 08010 Barcelona, y Departamento de Producción de Rumiantes, IRTA, 08140 Caldes de Montbui

*Correo electrónico: gonzalez.oscar@inia.es

INTRODUCCIÓN

Las primeras etapas del desarrollo fetal de mamíferos son determinantes para la vida adulta ya que es el momento en el que se producen importantes cambios en el ADN que son responsables y condicionan la diferenciación celular del embrión (Reik 2007). Así, por ejemplo, la falta de nutrientes durante la gestación se ha asociado con un mayor riesgo de sufrir enfermedades metabólicas en la vida adulta (Heijmans et al. 2008; Nijland et al., 2008). También los efectos maternos pueden alterar el fenotipo de la descendencia por los cambios en el epigenoma durante la gestación y la lactancia (Gluckman et al., 2008; Burdge et al., 2011). La lactancia es un período con altas demandas metabólicas que implican gran movilización de las reservas de energía del cuerpo, y este ambiente metabólico coincide con un período crítico en el control epigenético del desarrollo fetal (Bach, 2012) ya que los nutrientes deben dividirse entre la placenta y la glándula mamaria. Por lo tanto, parece razonable esperar algún efecto en el control epigenético en función del nivel de producción de leche de la madre, que podrían estar, en parte, actuando como factor de predisposición a determinadas enfermedades metabólicas comunes y otros caracteres complejos de importancia en el vacuno lechero (Beck y Bell 2010).

En el vacuno lechero, la fertilización del óvulo ocurre con mayor frecuencia entre los 70 y los 110 días después del parto, coincidiendo con el pico de la lactación. Esto hace que la mayoría (~ 75%) de la gestación coincide con la lactancia. El pico de producción se caracteriza por un cierto grado de balance energético negativo, ya que, especialmente en el caso de vacas de alta producción, no llegan a consumir los nutrientes necesarios para satisfacer las demandas metabólicas asociadas con altos volúmenes de producción de leche. Además, los modelos actuales utilizados para estimar las necesidades nutricionales de las vacas lecheras no tienen en cuenta las necesidades nutricionales del feto hasta alcanzar 190 días de vida fetal (Bach, 2012).

Ante esta situación, nos planteamos la hipótesis de que los individuos cuyo desarrollo fetal se produjo durante la lactancia materna puedan tener diferente programación prenatal que los concebidas en la ausencia de la lactancia, y esto puede afectar su rendimiento y expresión fenotípica en su vida productiva adulta. Además, puesto que hay una gran variabilidad en la producción de leche en ganado Holstein, que van desde los 5.000 a 14.000 kg de leche por lactación, sería de esperar que la programación prenatal de individuos concebidos en vacas de alta producción, y por lo tanto dentro de un escenario metabólico más desfavorable, sea diferente a la de aquellos animales gestados durante una lactación con menores niveles de producción de leche (Banos et al., 2007; Berry et al., 2008).

Así, el objetivo del presente estudio ha sido determinar el impacto sobre el rendimiento adulto (productividad, vida útil y la eficiencia metabólica) de la coexistencia de la embriogénesis con la lactación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron datos productivos de 40.065 primeras lactaciones proporcionados por las asociaciones regionales del País Vasco, Girona y Navarra con un total de 131.308 animales en el pedigrí. Se estudió el efecto de la presencia o ausencia de lactación sobre diferentes

caracteres de la progenie: kg leche en primera lactación; ratio de grasa y proteína (F/P) y longevidad funcional. Los fenotipos fueron previamente ajustados por aquellos efectos ambientales y genéticos que se incluyen en los modelos de evaluación genética (edad al parto, región-año de parto, rebaño-año de parto, días en lactación y efecto aditivo genético. En el caso de longevidad funcional, los días en lactación se corrigieron además por los kg de leche producidos en primera lactación. Los residuos resultantes de estos modelos fueron utilizados como variable dependiente para analizar el efecto de los efectos mencionados aplicando el siguiente modelo:

$$\mathbf{v} = \mathbf{1}'\mu + \mathbf{m}\beta + \mathbf{e}.$$

siendo \mathbf{y} el residuo procedente de las evaluaciones genéticas, μ una media poblacional, $\mathbf{1}$ un vector de unos. \mathbf{m} la matriz de incidencias del efecto ambiente materno entendido como la concurrencia de la lactación con la embriogénesis. β la estima de dicho efecto distribuido como $N(0, \sigma_m^2)$. \mathbf{v} \mathbf{e} los residuos distribuidos como $N(0, \sigma^2)$ siendo σ_m^2 la varianza de efectos maternos y σ^2 la varianza residual. Dicho modelo se analizó utilizando estadística Bayesiana mediante el algoritmo de cadenas de Markov.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media posterior de los contrastes con respecto a la no concurrencia con la lactación materna (error de MonteCarlo, MCs.e., entre paréntesis) fueron -18 (0,01), -47 (0,02) y -91 (0,02) kg de leche para la primera, segunda y tercera lactación, respectivamente (Los intervalos de máxima probabilidad de la distribuciones posteriores de estos contrastes no contuvieron a cero en ninguno de los casos) Estas diferencias crecientes podrían ser debidas a un efecto de acumulación a través de las lactaciones, acumulado mutaciones desfavorables en la línea germinal, y / o una mayor cantidad de marcas epigenéticas (que se transmiten al embrión) se acumula en las vacas más viejas.

En relación a la vida productiva, las vacas que fueron concebidas en novillas no lactantes mostraron una mayor eficacia para evitar el desecho involuntario que aquellas gestadas durante la lactación materna. En este caso, las estimas de las medias posteriores de los contrastes fueron 23 (0,003), 15 (0,003) y 9 (0,005) días más en lactación para las vacas gestadas en madres no lactantes en comparación con las gestadas en animales de primera, segunda y tercera o posterior lactación, respectivamente. Además, las hembras que fueron concebidas en madres no lactantes vivieron más que las concebidas durante la primera, segunda y tercera o subsiguientes lactaciones con probabilidades igual a 1, 0,995 y 0,90, respectivamente.

Las distribuciones posteriores de los contrastes para la relación grasa proteína (GP) en leche resultaron en medias posteriores entre 0,1 y 0,8% para aquellas vacas gestadas durante la lactación materna, sin mostrar una tendencia clara en función del nivel de producción materno. Las distribuciones posteriores no contuvieron al cero con una probabilidad mayor de 0,999 en todos los casos. Mayores ratios de GP se asocian con una eficiencia metabólica insuficiente y con problemas metabólicos como la cetosis (Kossaibati y Esslemont (1997).

En general, estos resultados indican que la coincidencia de la gestación durante la lactancia ejerce un efecto sobre el feto, con un grado probable de programación celular, causando efectos a largo plazo sobre el rendimiento lechera y la eficiencia metabólica de las crías, afectando esto a su longevidad.

Los autores son conscientes de que aunque los resultados obtenidos son compatibles con la existencia de posibles modificaciones genéticas o epigenéticas que pueden darse en el feto y que pueden estar relacionadas con el aumento de edad de la vaca, este estudio no proporciona evidencia directa de las mismas por lo que es evidente la necesidad de más estudios para abordar esta hipótesis realizando análisis de metilación en ADN.

REFERENCIAS

Bach, A. 2012. Nourishing and managing the dam and postnatal calf for optimal lactation, reproduction, and immunity. *J. Anim. Sci.* 90:1835–1845. doi:10.2527/jas.2011-4516. • Banos G., Brotherstone S., Coffey M.P. 2007. Prenatal maternal effects on body condition score, female fertility, and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **90**: 3490–3499. • Bell G., Beck S. 2010. The epigenomic interface between genome and environment in common complex diseases. *Briefings in Functional Genomics* **9**(5-6): 477-485 doi:10.1093/bfgp/elq026 • Berry D.P., Lonergan P., Butler S.T., Cromie A.R., Fair T. et al. 2008. Negative influence of high maternal milk production before and after conception on offspring survival and milk production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **91**: 329-337 • Burdge G.C., Hoile S.P., Uller T., Thomas N.A., Gluckman P.D. et al. 2011. Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition. *PLoS ONE* **6** (11): e28282. doi:10.1371/journal.pone.0028282 • Gluckman P.D., Hanson M.A., Cooper C., Thornburg K.L. 2008. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* **359**:61-73. • Heijmans B.T., Tobi E.W., Stein A.D., Putter H., Blauw G.J. et al. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *PNAS* **105**, 44. • Kossaibati M.A., Esslemont R.J. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.* 154:41-51 • Nijland M.J., Ford S.P., Nathanielsz P.W. 2008. Prenatal origins of adult disease. *Curr Opin Obstet Gynecol.* **20**(2): 132-8. • Reik W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**:425–32.

INFLUENCE OF LACTATION ON THE EMBRYO: MATERNAL EFFECT OR EPIGENETICS?

ABSTRACT: Epigenetic regulation in mammals begins in the first stages of embryogenesis. This prenatal programming overlaps with lactation in dairy cattle, and determines in part, phenotype expression in adult life. The transgenerational effect when embryo development coincides with maternal lactation was analyzed. Longitudinal phenotypic data for milk yield (kg), ratio of fat-protein content in milk during first lactation, and lifespan (d) from 40,065 cows were adjusted for environmental and genetic effects using a Bayesian framework. Then, the effect of different maternal circumstances was determined on the residuals. The maternal-related circumstances were 1) presence of lactation, 2) maternal milk yield level, and 3) occurrence of mastitis during embryogenesis.

Females born to mothers that were lactating while pregnant produced between 18 and 91 kg less milk (depending on parity number of the mother) and their lifespan was between 23 and 9 days shorter than those born to nulliparous cows. Similar results were obtained for milk fat to protein ratio, which was analyzed as a metabolic efficiency indicator.

Our data provide evidence of a trans-generational effect when pregnancy and lactation coincide, and its potential epigenetic origin should be further studied using DNA methylation data.

Keywords: epigenetics, trans-generational effect, energy balance

VARIANZA Y COVARIANZA DEL PARENTESCO EN UN LOCUS

García-Cortés¹, L.A., Legarra², A., Chevalet³, C. y Toro⁴, M. A.

¹Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Madrid, Spain. garcia@inia.es

²INRA, UR 631 SAGA, Castanet-Tolosan, France

³INRA, UMR 444 LGC, Castanet-Tolosan, France

⁴Departamento de Producción Animal, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

INTRODUCCIÓN

El grado de parentesco entre dos individuos mide la proporción del genoma que es idéntico por descendencia y se infiere a partir de la información genealógica. El parentesco es una probabilidad invariable para una determinada relación genealógica. Sin embargo, existe variabilidad en su valor realizado como consecuencia del muestreo mendeliano y el ligamiento. Por ejemplo, dependiendo de la suerte durante el muestreo, dos hermanos completos pueden compartir los dos alelos, uno o incluso ninguno, mientras que un padre y un hijo, en ausencia de consanguinidad, siempre comparten uno y solo uno. Ya se han publicado fórmulas para calcular los momentos de algunos tipos de parentescos (Hill y Weir, 2011; Hill & Weir, 2012) pero no una fórmula general.

Para un locus, el parentesco entre dos individuos es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar, uno por individuo, sean idénticos por descendencia. El coeficiente de fraternidad se define como la probabilidad de que los genotipos de dos individuos (ambos alelos) sean idénticos por descendencia en un cierto locus. El parentesco y la fraternidad realizados son los valores equivalentes observados en cada individuo.

En este trabajo se presenta un método sencillo para calcular varianzas y covarianzas entre parentescos y fraternidades realizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En esta sección mostramos como obtener las varianzas y covarianzas buscadas a partir de los estados de identidad (Harris, 1964; Gillois, 1964) que se suelen calcular a partir de los coeficientes de parentesco generalizados (Karigl, 1981). Estos estados son bien conocidos y se presentan en la figura 1.

Cada estado indica las relaciones de identidad por descendencia de las cuatro copias después de la segregación acontecida en los padres de ambos individuos, es decir, es una descripción exhaustiva de todos los posibles estados de identidad realizada. Los estados S_i se presentan en cada pareja con una probabilidad Δ_i . Estas probabilidades pueden obtenerse a partir de la relación genealógica de ambos individuos (Karigl, 1981). Por ejemplo, dos hermanos completos no consanguíneos sólo pueden estar en tres estados: $\Delta_7 = 0.25$, $\Delta_8 = 0.5$ y $\Delta_9 = 0.25$, en cambio, todas las parejas padre-hijo están en el estado S_8 con una probabilidad $\Delta_8 = 1$. Ambos parentescos son igual a 0.5 pero por motivos diferentes y con variabilidad realizada diferente.

En general, las 9 probabilidades que caracterizan una relación son parámetros de una distribución categórica (caso particular de la distribución multinomial con una sola observación) y el estado de identidad realizado es un valor muestreado de esta distribución. Si en la notación usamos corchetes de Iverson, los momentos de esta distribución categórica son:

$$E([i = k]) = \Delta_k$$

$$\text{Var}([i = k]) = \Delta_k(1 - \Delta_k) \quad (1)$$

$$\text{Cov}([i = k], [j = m]) = -\Delta_k \Delta_m$$

donde “i=k” significa que el evento “i” está en el estado “k”. En la notación de Iverson $[i = k]$ es 1 si el evento “i” está en el estado “k” y 0 en caso contrario. El parentesco de dos individuos, ϕ_{ij} , puede expresarse a partir de los coeficientes de identidad con la siguiente expresión.

$$\phi_{ij} = \Delta_1 + \frac{1}{2}(\Delta_3 + \Delta_5 + \Delta_7) + \frac{1}{4}\Delta_8$$

La varianza del parentesco se calcula tomando varianzas en la expresión anterior y usando la fórmula (1). Tras un poco de álgebra (García-Cortés et al., 2013) se puede demostrar que

$$\text{var}(\phi_{ij}) = \sum w_k^2 \Delta_k - \sum w_k \Delta_k \sum w_k \Delta_k$$

donde w_i es cada elemento del vector $(1 \ 0 \ 0,5 \ 0 \ 0,5 \ 0 \ 0,5 \ 0,25 \ 0)$. Esta expresión tiene una interpretación muy sencilla usando los parentescos generalizados de Karigl (1981)

$$\text{var}(\phi_{ij}) = \phi_{ij,ij} - \phi_{ij}\phi_{ij}$$

donde $\phi_{ij,ij}$ es el parentesco “de doble pareja”. Los detalles acerca de su significado e interpretación pueden consultarse en Karigl (1981).

Esta última fórmula se puede extender para la covarianza entre dos coeficientes de parentesco de esta forma

$$\text{cov}(\phi_{ij}, \phi_{kl}) = \phi_{ij,kl} - \phi_{ij}\phi_{kl}$$

También puede extenderse para en cálculo de la varianza de la fraternidad sencillamente modificando los valores de w_i , que en este caso serían $(1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1 \ 0 \ 0)$.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

A modo de ejemplo, calcularemos la relación entre de Dash 2º y Moll 3º, probablemente los dos perros más relevantes en la fundación de la raza Setter inglés (Laverack, 1872). Su parentesco es el producto de sucesivos cruces entre hermanos completos que, al estar finalmente cruzados con una línea colateral, presenta los 9 coeficientes de identidad distintos de cero. Esta genealogía puede encontrarse en Laverack (1872) o García-Cortés et al (2013).

De Dash 2º y Moll 3º, se calculó la varianza del parentesco usando $w = (1 \ 0 \ 0,5 \ 0 \ 0,5 \ 0 \ 0,5 \ 0,25 \ 0)$, también se calculó la varianza de la fraternidad usando $w = (1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1 \ 0 \ 0)$, la de la consanguinidad de Dash 2º usando $w = (1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0)$ y la varianza de la consanguinidad de Moll 3º usando $w = (1 \ 1 \ 0 \ 0 \ 1 \ 1 \ 0 \ 0 \ 0)$. Los resultados se contrastaron con los obtenidos usando una simulación por goteo de genes.

En la Tabla 1 se presentan los cuatro coeficientes (parentesco, fraternidad y las dos consanguinidades) y sus correspondientes varianzas realizadas sobre un locus. Los

resultados son similares a los obtenidos a partir de un algoritmo de goteo de genes convencional.

Es algo bien conocido que la consanguinidad de un individuo es igual al parentesco entre los padres, pero al considerar valores realizados, sólo las esperanzas coinciden, siendo la varianza de la consanguinidad mayor que la varianza del parentesco. Por ejemplo, la varianza del parentesco entre Cora 2º y Sting, padres de Dash 2º, fue de 0.0922, mucho menor que el valor 0.2451 presentado en las tabla 1. Esto se debe a que la consanguinidad de Dash 2º podría considerarse el parentesco entre los padres “realizado” y por tanto acumulando más variación. El procedimiento presentado puede extenderse a modelos con más de un locus usando una distribución multinomial en la ecuación 1, es decir, dividiendo las varianzas por el número efectivo de loci (Goddard, 2009).

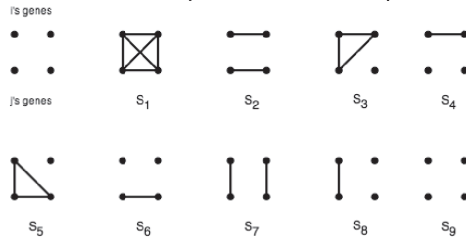
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• García-Cortés, L.A., Legarra, A., Chevalet, C. & Toro¹, M. A. 2013. Plos One (en prensa) • Gillois, M. 1964. Thesis, Faculté des Sciences de Paris • Goddard, M. 2009. Genetica 136:245-257 • Harris, D.L. 1964. Genetics 50:1319-1348 • Hill, W.G. & Weir, B.S. 2011. Genet Res 93: 47-64 • Hill, W.G. & Weir B.S. 2012. Genet Res 94:267-74 • Karigl, G. 1981. Ann Hum Genet 45:299-305 • Laverack, E. (1872) Longmans, Green and co., London

Tabla 1. Relaciones exactas entre Dash 2º y Moll 3º y sus correspondientes estimaciones usando goteo de genes (100000 muestras).

	Método exacto		Goteo de genes	
	Media	Varianza	Media	Varianza
Parentesco	0.5371	0.0810	0.5367	0.0811
Fraternidad	0.4194	0.2435	0.4169	0.2431
Consanguinidad Dash 2º	0.4297	0.2451	0.4309	0.2452
Consanguinidad Moll 3º	0.4844	0.2498	0.4845	0.2497

Figura 1. Los nueve estados de identidad por descendencia (las líneas marcan identidad).



VARIANCE AND COVARIANCE OF KINSHIP AT ONE LOCUS

ABSTRACT: The relationship between pairs of individuals is an important topic in many areas of population and quantitative genetics. It is usually measured as the proportion of the genome identical by descent shared by the pair and it can be inferred from pedigree information. But there is a variance in actual relationships as a consequence of Mendelian sampling, whose general formula has not been developed. The goal of this work is to develop this general formula for the one-locus situation. We provide simple expressions for the variances and covariances of all actual relationships in an arbitrary complex pedigree. The proposed method relies on the use of the nine identity. Formulas have been checked by computer simulation.

Keywords: Identity coefficients, coancestry, kinship, fraternity

MEDIDAS DE CONSANGUINIDAD AL VIEJO Y NUEVO ESTILO

Rodríguez, MC.¹, Fernández Al., Barragán C., Silió L.
Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid
E-mail: valdo@inia.es

INTRODUCCIÓN

La forma tradicional de calcular la consanguinidad individual en poblaciones con genealogía conocida ha sido el coeficiente de consanguinidad, definido como la probabilidad de que dos alelos homólogos sean idénticos por descendencia. En muchas poblaciones de animales domésticos, especialmente en aquellas manejadas en sistemas extensivos, el registro genealógico es inexistente o incompleto. En este caso, se han propuesto como alternativa diversas medidas de homocigosidad basadas en múltiples marcadores genéticos, aunque su utilidad depende de la dispersión de la consanguinidad genealógica individual en cada población (Pemberton, 2004). Recientemente esta opción se ha reforzado por la disponibilidad de plataformas de genotipado masivo de SNPs (Ramos et al., 2009). La obtención de miles de genotipos permite asimismo la detección de tramos de homocigosidad (ROH) que algunos autores consideran especialmente adecuados para la estimación de la homocigosidad a nivel del genoma y de la depresión consanguínea (Keller et al., 2011). El objetivo de este estudio fue comparar, en un escenario de moderada dispersión de la consanguinidad, el clásico coeficiente de consanguinidad (F_{PED}) con dos medidas basadas respectivamente en la homocigosidad molecular (F_{MOL}) y en la proporción de tramos de homocigosidad (F_{ROH}).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y Genotipos. Se genotiparon, mediante el *Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA), muestras de ADN de 217 reproductoras Ibéricas de la estirpe Torbiscal, que incluyen: a) un grupo C1 de 54 cerdas nacidas entre 1994 y 1998 con un número medio equivalente de generaciones discretas de 21,04 (SD=0,57) y una consanguinidad media 0,145 (SD=0,005), b) un grupo contemporáneo S de 54 cerdas pertenecientes a un experimento de selección con 22,72 (SD =0,78) generaciones y consanguinidad media 0,213 (SD=0,019), y c) un grupo C2 de 109 cerdas nacidas de 2004 a 2010, con 26,13 (SD=0,74) generaciones y consanguinidad 0,175 (SD=0,023). Tras pasar el control de calidad estandar, descartar los SNPs que presentaban un MAF<0.05 y los no mapeados en autosomas según Sscrofa 10.2, el número de SNPs autosómicos utilizados fue de 26.646.

Análisis de datos. Los coeficientes F_{PED} se calcularon a partir de un pedigree completo con 2.663 trios animal-padre-madre. Los valores de F_{MOL} se calcularon, para el genoma y para cada uno de los 18 autosomas, como la proporción de SNPs en homocigosis. Los ROHs individuales fueron identificados utilizando el programa PLINK (Purcel et al., 2007), estableciendo un tamaño mínimo de ROH de 30 SNPs, densidad mínima de 1SNP/100 kb, distancia máxima entre SNPs de 1Mb y permitiendo un máximo de dos genotipos faltantes y un heterocigoto. A partir de los tramos ROH identificados se calcularon los valores de F_{ROH} para cada uno de los autosomas y para el genoma completo. Las correlaciones esperadas entre F_{PED} y F_{MOL} se calcularon a partir de la fórmula propuesta por Slate et al. (2004) utilizando el número total (n) o el número efectivo (K_{eff}) de SNPs independientes (Moskvina y Schmidt, 2008). Los valores de desequilibrio de ligamiento entre marcadores se calcularon mediante el programa Haploview (Barret et al., 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fuerte desequilibrio presente en las poblaciones de ganado hace que el número efectivo de SNPs independientes (K_{eff}) sea sensiblemente inferior al de SNPs genotipados. Ello reduce la magnitud de la correlación esperada entre F_{PED} y F_{MOL} , aunque estos valores exceden ampliamente las correlaciones observadas (Tabla 1). Pese a la moderada correlación observada entre F_{PED} y F_{MOL} , con los dos parámetros se obtuvieron similares tasas de endogamia y censos efectivos por generación en los animales pertenecientes al

programa de conservación de la estirpe (animales C1+C2): $\Delta F_{PED} = 0,0075$ y $\Delta F_{MOL} = 0,0073$, siendo los respectivos tamaños efectivos 66,4 y 67,8. Los correspondientes valores en el grupo S de selección experimental fueron $\Delta F_{PED} = 0,0192$ y $\Delta F_{MOL} = 0,0235$, y los respectivos tamaños efectivos 26,1 y 21,3.

Tabla 1. Desequilibrio de ligamiento (LD), correlaciones predichas entre el coeficiente genealógico y el molecular calculadas para el número total (n) y número efectivo (K_{eff}) de SNPs, así como las observadas utilizando los coeficientes moleculares F_{MOL_SCC} y F_{ROH_SCC} , para las 217 cerdas Torbiscal en los 18 autosomas y en el genoma.

SSC	SNPs		LD	Pred $r(F_{PED}, F_{MOL_SCC})$		r Observadas	
	n	K_{eff}		n SNPs	K_{eff}	F_{PED}, F_{MOL_SCC}	F_{PED}, F_{ROH_SCC}
Genoma	26.646	16.359	0,177	0,968	0,950	0,679	0,685
1	3.222	1.669	0,199	0,808	0,703	0,224	0,261
2	1.492	718	0,207	0,669	0,529	0,327	0,215
3	1.579	1.014	0,166	0,693	0,610	0,161	0,255
4	1.891	1.132	0,174	0,719	0,625	0,117	0,128
5	1.237	797	0,168	0,649	0,565	0,192	0,147
6	1.544	889	0,182	0,665	0,560	0,245	0,277
7	1.745	1.054	0,179	0,715	0,622	0,276	0,283
8	1.523	864	0,182	0,666	0,558	0,192	0,342
9	1.803	1.120	0,168	0,717	0,630	0,368	0,417
10	928	657	0,157	0,593	0,527	0,161	0,146
11	1.026	665	0,159	0,604	0,521	0,213	0,192
12	724	509	0,135	0,542	0,476	0,098	0,131
13	1.983	1.056	0,211	0,734	0,619	0,209	0,323
14	1.697	892	0,197	0,704	0,584	0,208	0,229
15	1.550	845	0,191	0,670	0,555	0,409	0,429
16	1.009	619	0,166	0,590	0,497	0,331	0,286
17	828	525	0,164	0,563	0,477	0,137	0,147
18	865	560	0,174	0,567	0,484	0,168	0,135

A nivel cromosómico las discrepancias entre las correlaciones predichas y observadas son aún mayores. Las correlaciones entre F_{PED} y F_{ROH} tienen valores análogos o ligeramente superiores a las obtenidas entre F_{PED} y F_{MOL} para 12 de los 18 autosomas y para el conjunto del genoma analizado. El empleo de los valores de F_{ROH} podría ser interesante en futuros estudios de depresión consanguínea a nivel cromosómico.

En ausencia de teoría sobre esta medida de consanguinidad parece conveniente examinar algunas de sus características. Diversos trabajos han indicado que la consanguinidad reciente genera ROHs grandes (Kirin et al., 2010). El número medio de ROHs pequeños (<5Mb), medianos (5-10Mb) y grandes (>10Mb) en los tres grupos de cerdas aparece reflejado en la Figura 1a. No se aprecian diferencias entre los tres grupos para los ROHs de pequeño tamaño, mientras si se observa una mayor proporción en los grupos más consanguíneos (C2 y S) de ROHs medianos y grandes, especialmente clara para estos últimos. En vista de la relación entre consanguinidad genealógica y tamaño de ROHs, se calcularon las correlaciones entre F_{PED} y F_{ROH} , para ROHs >5Mb y >10Mb, con valores respectivos de 0,685 y 0,671. Los valores de correlación mostrados en la Tabla 1 corresponden a las obtenidas con el primer criterio (>5Mb).

Bosse et al. (2012) han analizado la distribución de los ROH a lo largo del genoma en jabalíes y diversas razas de cerdos domésticos. Para ello estandarizaron la longitud de todos los cromosomas calculando en cada posición relativa las proporciones de los ROH de

distintos tamaños. Nuestros resultados (Figura 1b) confirman la disminución del tamaño de los ROH en los extremos cromosómicos atribuible a la mayor tasa de recombinación en los mismos (Muñoz et al., 2012). Las distribuciones de los ROHs agrupados por tamaño presentan, en cerdos ibéricos, un patrón intermedio entre los jabalíes europeos y las razas de cerdos europeas intensamente seleccionadas.

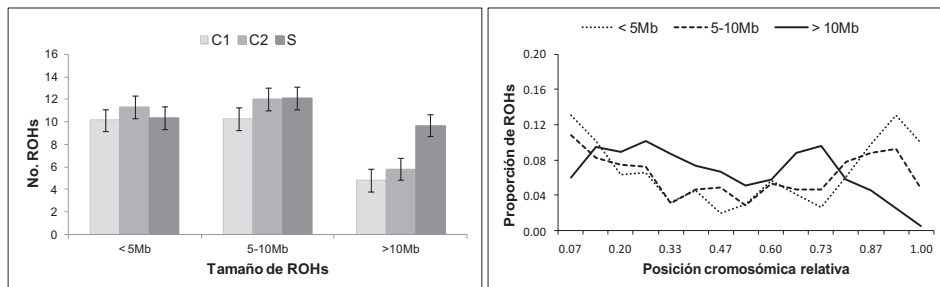


Figura 1 a). Número medio de ROHs en las tres clases establecidas (<5Mb, 5- 10Mb y >10Mb) en los grupos C1, C2 y S, **b)** Distribución de los ROHs en función de su posición cromosómica

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Barrett J.C. et al. 2005. *Bioinformatics* 21(2): 263-265. • Bosse M. et al. 2012. *PLOS Genet.* 8: e103100. • Keller L.F. & Waller M. 2002. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230-241. • Kirin M. et al. 2010. *PLoS ONE* 5: e13996. • Moskvina V. & Schmidt K.M. 2008. *Genet. Epidemiol.* 32: 567-573. • Muñoz M. et al. 2012. *Anim. Genet.* 43 (5): 620-623. • Pemberton J., 2004. *Trends Ecol. Evol.*, 19: 613-615 • Purcel S. et al, 2007. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 559-575. • Ramos A.M. et al. 2011. *Anim. Genet.* 42: 613-620. • Slate J. et al. 2004. *Heredity* 93: 255-265.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el proyecto RTA2011-00113-00-00 (cofinanciación FEDER). Agradecemos muy especialmente la colaboración de Pablo García Ramos y del personal encargado del manejo de los animales en el CIA 'Dehesón del Encinar' (Oropesa, Toledo), así como la asistencia técnica de Fabián García y Rita Benitez.

OLD AND NEW WAYS FOR MEASURING INBREEDING

ABSTRACT:

Traditional inbreeding measures have been calculated using pedigree information. However, when genealogy is not available, several alternative inbreeding metrics based on multiple markers have been proposed. The emergence of the high throughput SNP genotyping platforms reinforces this option, although its usefulness depends on the genealogical inbreeding dispersion. In the present analysis of inbreeding of 217 Iberian sows of the Torbiscal strain, we have calculated old and new SNP-derived inbreeding metrics from the pedigree (F_{PED}), the homozygosity of 26,646 typed SNPs (F_{MOL}) and runs of homozygosity (F_{ROH}) identified in the same genotypes. Although the results showed a moderate correlation between F_{PED} and F_{MOL} (0.679), similar inbreeding rates per generation and effective population sizes were estimated from pedigree and molecular metrics. A slightly greater correlation between F_{PED} and F_{ROH} (0.685) was observed. The detailed examination of ROH sizes showed a higher proportion of medium and large ROHs in the most inbred animals. Besides, the distributions across chromosome positions of ROHs grouped by size confirmed the negative effect on the ROH size of the high recombination rates in the telomeres. The pattern of these distributions in this Iberian pig strain is intermediate between those of European wild boars and of strongly selected domestic breeds.

Keywords: Iberian pig, inbreeding, ROH

ESTUDIO INICIAL DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DEL CONEJO IBICENCO A PARTIR DE INFORMACIÓN GENEALÓGICA

Martín de la Rosa, A.¹, Cervantes, I.², García-García, R.M.³, Rebollar, P.G.⁴, Arias-Álvarez, M.², Lorenzo, P.L.³, Gutiérrez, J.P.²

¹Subdirección General de Medios de Producción Ganaderos, MAGRAMA. 28071 Madrid.

²Dpto Producción Animal. UCM. Madrid. ³Dpto. Fisiología (Fisiología Animal). UCM.

MADRID. ⁴Dpto Producción Animal. UPM. Madrid. gutgar@ ucm.es

INTRODUCCIÓN

La necesidad de impedir la desaparición de las razas locales, minoritarias o en peligro de extinción ha sido un argumento constante de las agencias internacionales de agricultura, científicos individuales y entusiastas de las razas autóctonas (Alderson, 1978). El conejo ibicenco es un animal de origen incierto, descrito desde hace siglos en la isla de Ibiza, con elevada rusticidad que le ha permitido sobrevivir en las granjas pitiusas a la introducción de otras razas comercialmente más interesantes. Su capa presenta la peculiaridad de tener fijado el gen Dutch que se caracteriza por presentar un collar blanco, perfil de la cabeza, hocico y extremos de las patas de color blanco. El resto de la capa puede ser negro, gris o marrón con matices de intensidad. La Asociación de Criadores de conejo ibicenco pretende impulsar la raza comenzando por su caracterización en busca de que sea admitida en el catálogo nacional de razas autóctonas. Como un primer paso, el objetivo de este trabajo fue analizar la estructura genética de esta población a partir de la información de su Libro Genealógico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha utilizado la información del Libro Genealógico proporcionado por la Asociación de criadores, con todos los individuos registrados hasta noviembre de 2011.

Los valores que se presentan aquí corresponden a 55 animales nacidos entre el 1 de diciembre de 2009 y el 7 de noviembre de 2011. En la base de datos analizada se encontraron 17, 22 y 16 animales de los colores respectivamente gris, marrón y negro, de los cuales 15 eran machos y 40 hembras, figurando 28 vivos.

Se ha analizado la genealogía para establecer parámetros relacionados con la estructura poblacional: intervalo generacional, definido como la edad media de los padres cuando nacen sus descendientes que luego serán reproductores (James, 1977), coeficiente de consanguinidad y tamaños efectivos o N_e (Falconer y Mackay, 1996), mediante los tamaños efectivos realizados obtenidos a partir de incrementos de consanguinidad (Gutiérrez et al., 2009) y de coascendencias (Cervantes et al., 2011), tamaño efectivo de fundadores (Lacy, 1989), de ancestros (Boichard et al., 1997), número efectivo de genomas fundadores (Ballou y Lacy, 1995).

Para todos los cálculos se definió como población de referencia la compuesta por los 28 animales vivos. Se utilizó el programa ENDOG v4.8 (Gutiérrez y Goyache, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Intervalo Generacional (Tabla 1) fue de 8 meses, lo que en principio permitiría llevar a cabo 3 generaciones en 2 años. Si se incluye a todos los animales independientemente de que hayan sido padres, la edad media al nacer sus descendientes fue de 9 meses, lo que sugiere que la reposición está realizándose de forma más acelerada al intervalo generacional por azar. La vía progenitor-hembra fue mayor que la vía progenitor-macho, lo que muestra un interés superior en reponer los machos.

El número medio de generaciones equivalentes completas (Maignel et al., 1996) fue de 1,82 para los animales nacidos en la población de referencia, lo que supone aún una elevada laguna en el conocimiento de pedigrí.

Los valores medios de consanguinidad y de relación media para la población de referencia fueron de 8,0% y 18,8%, respectivamente, valores muy elevados para el bajo conocimiento de pedigrí que hay disponible. Bajo apareamiento aleatorio el valor

de consanguinidad debe ser similar a la mitad del coeficiente de relación media, cosa que se cumple en este caso, mostrando que no existe una especial tendencia a cruzar individuos emparentados. Si analizamos el porcentaje de apareamientos altamente consanguíneos a lo largo de la historia de la raza tenemos que el 14,55% de los apareamientos se ha dado entre medios hermanos y el 7,27% entre padre e hijos.

El tamaño efectivo realizado basado en incrementos de consanguinidad individual, por estar basado en incrementos de consanguinidad individual reales, refleja todos los fenómenos ocurridos en cada individuo de la población, como el solapamiento generacional, la selección y la subdivisión que pueda existir. Muestra por lo tanto las consecuencias de la política de apareamientos llevada a cabo, de los posibles cuellos de botella y del tamaño de la población base, todos ellos, factores que se reflejan en las genealogías (Cervantes et al., 2008; Gutiérrez et al., 2008; Gutiérrez et al., 2009). Este parámetro resultó ser $6,13 \pm 2,02$ utilizando los incrementos individuales de consanguinidad, valor extremadamente inferior al umbral marcado en la bibliografía para clasificar una raza en peligro (Meuwissen, 2009). El tamaño efectivo basado en incrementos de coascendencias, que informa del tamaño efectivo de la población si hubiera apareamiento aleatorio (Cervantes et al., 2011), resultó ser de magnitud similar ($8,45 \pm 1,25$). El cociente entre ambos presenta un valor de 1,38 lo que indica una cierta tendencia a apareamientos consanguíneos debido al intento de mantener las tres capas de la raza de forma independiente. En cualquier caso partimos de un valor de N_e enormemente reducido para conservar esta población.

Otras aproximaciones llevadas a cabo en la base de datos fueron: en función de la varianza del número de descendientes distinguiendo entre sexos en padres e hijos (Hill, 1979): 3,2 para padres nacidos en 2009 y 5,6 para los nacidos en 2010; en función de la regresión de F sobre generación equivalente (Gutiérrez y Goyache, 2005): 3,9; en función de la regresión de F sobre fecha de nacimiento (Gutiérrez et al., 2003): 7,9; en función de la regresión logarítmica de (1-F) sobre generación (Pérez-Enciso, 1995): 3,6; en función de la regresión logarítmica de (1-F) sobre fecha de nacimiento: 6,8. Reuniendo todos los valores de N_e obtenidos se observa que en todos los casos los valores están entre 3,2 y 8,5. En nuestro conocimiento no existe ninguna población viva con un censo efectivo tan reducido. Dado que la raza aún no está oficialmente reconocida dentro del catálogo nacional de razas autóctonas, urge la inscripción de más animales procedentes de diversos criadores en el Libro Auxiliar.

En cuanto a los parámetros que determinan la probabilidad de origen de los genes, el número total de fundadores y de ancestros que explicarían el 100% de la variabilidad genética existente en la raza fue de 8 en ambos casos, mostrando que en un pedigrí de tan escasa profundidad como el presente, no se han producido cuellos de botella. El estudio de la probabilidad de origen de los genes se resume en 3 parámetros: el número efectivo de fundadores (f_e), número efectivo de ancestros (f_a) y número efectivo de genomas fundadores (f_g). Todos ellos fueron iguales a 6, reflejando que la baja profundidad de pedigrí no permite hacer distinciones entre las pérdidas de variabilidad originadas por el desigual equilibrio en el uso de los fundadores, los cuellos de botella, u otras causas de pérdida de variabilidad genética. Sin embargo, parece haber habido un uso preferente de algunos fundadores ya que el número efectivo fue de 6, inferior al número total de 8, cosa que también se observa en el número de ancestros que determinan el 50% de la variabilidad que se reduce a 2. Al igual que con el tamaño efectivo de reproductores, no conocemos población con un valor tan reducido de estos parámetros, confirmando la conclusión previa sobre la necesidad de incrementar el censo mediante la inscripción de animales en el Libro Auxiliar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderson, L., 1978. London, 192 pp.
- Ballou J.D., Lacy, R.C., 1995. New York: Columbia University Press, pp: 76-111.
- Boichard, D., Maignel, L., Verrier, E., 1997.

Genet Sel Evol 29: 5-23. • Cervantes, I.; Goyache, F.; Molina, A.; Valera, M.; Gutiérrez, J.P., 2008. J. Anim. Breed. Genet., 125: 301-310. • Cervantes, I., Goyache, F., Molina, A., Valera, M., Gutiérrez, J.P. 2011. J. Anim. Breed. Genet., 128: 56-63 • Falconer, D.S.; Mackay, F.C. 1996. Longman Group Ltd. England • Gutiérrez, J.P.; Altarriba, J.; Díaz, C.; Quintanilla, R.; Cañón, J.; Piedrafita, J. 2003. Genet. Sel. Evol., 35, 43-64. • Gutiérrez, J.P.; Goyache, F. 2005. J. Anim. Breed. Genet., 122: 172-176. • Gutiérrez, J.P.; Cervantes, I.; Molina, A.; Valera, M.; Goyache, F. 2008. Genet. Sel. Evol., 40: 359-378. • Gutiérrez, J.P.; Cervantes, I.; Goyache, F.; 2009. J. Anim. Breed. Genet., 126: 327-332. • Hill WG, 1979. Genetics, 92: 317-322. • James, J.W. 1977. Anim. Prod., 24:109-112. • Lacy, R.C. 1989. Zoo. Biol., 8: 111-123. • Maignel, L.; Boichard, D.; Verrier, E. 1996. Interbull Bulletin, 14: 49-54. • Meuwissen, T.H.E., 2009. Acta Agriculturae Scand., Section A., 59 : 71-79. • Pérez-Enciso M, 1995. Use of the uncertain relationship matrix to compute effective population size, J. Anim. Breed. Genet. 112: 333-340.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el INIA (MEC-INIA, RZ2010-00012). La información fue cedida por la Asociación de Criadores de Conejo Ibicenco.

Tabla 1. Intervalos generacionales (en años) y edad de los padres a las que nacen sus hijos en las cuatro vías.

TIPO	N	Intervalo \pm desv. est.	N	Edad Padres \pm desv. est.
Padre-Hijo	4	0.6721 \pm 0.1010	6	0.6457 \pm 0.0798
Padre-Hija	6	0.7652 \pm 0.0958	19	0.8875 \pm 0.1305
Madre-Hijo	4	0.4832 \pm 0.0761	6	0.5389 \pm 0.0844
Madre-Hija	6	0.7000 \pm 0.1445	19	0.6922 \pm 0.0860
TOTAL	20	0.6706 \pm 0.0511	50	0.7425 \pm 0.0394

INITIAL STUDY OF GENETIC STRUCTURE OF IBIZA RABBIT FROM GENEALOGICAL INFORMATION

ABSTRACT: We analyzed the studbook of the “ibicenco” rabbit breed to study its genetic structure. The generation length was eight months. The average number of equivalent complete generations was 1.8 with a mean inbreeding coefficient of 8% and a mean average relatedness coefficient of 18.8%, showing shallow pedigree and high level of inbreeding. The effective population size, the effective number of founders and ancestors, and the founder genome equivalent turned out to be 6, a stable number from the foundation that reveals the need to increase the population census.

Keywords: population structure, effective population size, ibicenco rabbit, inbreeding

DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD DESATURASA Y ELONGASA ENTRE TEJIDOS Y GENOTIPOS DE CERDOS DUROC

Henríquez E, Ros-Freixedes R, Pena RN, Tor, M y Estany¹, J.

¹Universitat de Lleida, Departament de Producció Animal, Rovira Roure, 191, 25198 Lleida
jestany@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La composición de la grasa, y en particular el de contenido de ácido oleico, tiene cada vez más importancia en la calidad de la carne, ya que los ácidos grasos influyen aspectos tecnológicos como son la dureza, la vida útil y el sabor (Wood et al., 2003). Por su parte, el ácido oleico, es uno de los dos principales ácidos grasos monoinsaturados que se encuentran en los depósitos de grasa (Ren et al., 2004) y ha sido correlacionado positivamente con el sabor a carne de cerdo, la preferencia de sabor y la aceptabilidad general (Cameron et al., 2000). Ros-Freixedes et al. (2012) demostraron que el contenido de C18:1n-9 en músculo está determinado genéticamente y que por tanto es posible mejorarlo mediante selección. Se conoce que en las rutas de síntesis de C18:1n-9 intervienen enzimas desaturasas y elongasas cuya actividad puede variar entre tejidos y puede verse influida por variantes estructurales de los genes que las codifican, siendo la enzima clave que cataliza la biosíntesis del ácido oleico la estearoil-CoA desaturasa (Miyazaki y Ntambi, 2003). En este trabajo se presentan los resultados de un experimento diseñado para comprobar si existen diferencias en la actividad desaturasa (SCD) y elongasa (E) entre tejidos y genotipos para el gen *SCD* en cerdos Duroc.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el experimento se utilizaron 48 cerdos castrados Duroc, nacidos de los apareamientos entre 19 machos y 48 hembras. Todos ellos fueron criados en 3 lotes de forma similar a la indicada en Ros-Freixedes et al (2012). A los 205 días de edad, se sacrificaron en un matadero comercial, donde de cada uno de ellos se recogió una muestra de los músculos glúteo medio (GM) y semimembranoso (SM), de grasa subcutánea (GS), entre la tercera y cuarta últimas costillas, y de hígado (H). Las muestras de SM, GS y H se recolectaron inmediatamente después del sacrificio y se conservaron en nitrógeno líquido mientras que las de GM se tomaron después de refrigerarse la canal a 2°C durante 24 horas. Una vez descongeladas, las muestras se liofilizaron y pulverizaron. Una alícuota representativa de cada una de ellas se utilizó para determinar por duplicado su composición en ácidos grasos según Bosch et al. (2009), a la vez que se empleó una modificación del método para cuantificar C18:1n-7. Las 192 muestras se distribuyeron en un diseño factorial de 4 tejidos × 3 genotipos. En la **Tabla 1** se indica el porcentaje medio, respecto al total de ácidos grasos determinados, de los ácidos grasos considerados en este trabajo.

Tabla 1. Número de cerdos y porcentaje medio (desviación típica) de los ácidos grasos considerados en este trabajo según tejido

Ácido graso %	Glúteo medio	Semimembranoso	Grasa subcutánea	Hígado
n	48	48	48	48
C16:0	24.60 (0.84)	22.44 (1.03)	22.41 (1.21)	18.81 (2.25)
C16:1n-7	3.56 (0.45)	3.53 (0.49)	2.13 (0.29)	1.34 (0.46)
C18:0	11.61 (0.95)	10.68 (0.84)	11.66 (1.04)	20.88 (3.56)
C18:1n-9	39.65 (1.33)	40.04 (2.57)	40.58 (2.66)	20.12 (4.70)
C18:1n-7	5.71 (0.62)	6.51 (0.59)	2.61 (2.03)	3.01 (0.60)

Con el contenido de los ácidos grasos de la **Tabla 1** se calcularon para cada cerdo y tejido los índices $SCD1=C16:1n-7/C16:0$ y $SCD2=C18:1n-9/C18:0$, como indicadores de la

actividad de la enzima estearoil-CoA desaturasa, así como los E1=C18:0/C16:0 y E2=C18:1n-7/C16:1n-7 como indicadores de la actividad elongasa. Paralelamente, se extrajo una muestra de ADN de cada cerdo con el fin de genotiparlos según el polimorfismo AY487830:g.2281A>G descrito en la región promotora del gen *SCD* por Ros-Freixedes et al. (2013) en estas jornadas.

Las diferencias entre tejidos y genotipos para los índices SCD1, SCD2, E1 y E2 se analizaron mediante un modelo animal en el que se incluyeron como efectos fijos el lote (lotes 1 a 3), el tejido (GM, SM, GS y H) y el genotipo (AA, AG y GG), mientras que como efecto aleatorio se consideró el animal. Los efectos del tejido y del genotipo se contrastaron con la prueba de Kenward-Roger y la diferencia entre niveles dentro de factor con la prueba de Tukey-HSD. Se obtuvieron también mediante el método REML las correlaciones fenotípicas entre índices según tejido. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico JMP 8 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 2** se indican las diferencias entre índices según tejido y genotipo. Los índices desaturasa SCD1 y SCD2 son mayores en músculo, especialmente en SM, que en GS y H. Este comportamiento diferenciado de la estearoil-CoA desaturasa es similar a lo observado por Doran et al. (2006), quienes indicaron, que para una dieta reducida en proteína, la expresión proteica de SCD aumentaba en el músculo de cerdo (*longissimus thoracis et lumborum*) pero no en el tejido adiposo subcutáneo. En la población a la que pertenecen los cerdos utilizados en este experimento, la cual fue seleccionada para reducir el espesor de grasa dorsal a grasa intramuscular constante, Cánovas et al. (2009) reportaron una disminución significativa de la expresión proteica de SCD en tejido adiposo subcutáneo pero no en músculo (SM), mientras que Muñoz et al. (2013) no encontraron un efecto significativo de la selección genética en la expresión hepática de SCD. Estos resultados confirman que la proteína SCD se expresa de forma tejido-específica. Por el contrario, la actividad elongasa resulta mucho mayor en H y en GS, especialmente E2. El genotipo AA, en línea con los resultados de Ros-Freixedes et al. (2013), presenta mayor actividad SCD, particularmente evidente en SCD2. Por el contrario, no se observan diferencias entre genotipos para la actividad elongasa.

Tabla 2. Medias mínimo-cuadráticas (\pm error típico) de la actividad desaturasa y elongasa ($\times 100$) según tejido y genotipo del promotor del gen *SCD* porcino

	Índices			
	SCD1	SCD2	E1	E2
Tejido				
SM	15.66 \pm 0.25 ^a	377.91 \pm 5.49 ^a	48.88 \pm 2.49 ^b	188.48 \pm 6.17 ^b
GM	14.38 \pm 0.25 ^b	344.14 \pm 5.49 ^b	48.53 \pm 2.49 ^b	164.12 \pm 6.17 ^c
GS	9.45 \pm 0.25 ^c	329.45 \pm 5.49 ^b	53.30 \pm 2.49 ^b	257.76 \pm 6.17 ^a
Hígado	6.87 \pm 0.25 ^d	102.56 \pm 5.49 ^c	116.09 \pm 2.49 ^a	245.68 \pm 6.17 ^a
SNP g.2281A>G				
AA	12.10 \pm 0.25 ^a	300.50 \pm 5.32 ^a	67.30 \pm 1.98 ^a	209.75 \pm 5.91 ^a
GA	11.68 \pm 0.25 ^a	286.21 \pm 5.32 ^{ab}	64.80 \pm 1.98 ^a	209.59 \pm 5.91 ^a
GG	10.99 \pm 0.25 ^b	278.82 \pm 5.32 ^b	64.80 \pm 1.98 ^a	222.68 \pm 5.91 ^a
Índices SCD1 = C16:1n-7/C16:0, SCD2 = C18:1n-9/C18:0, E1 = C18:0/C16:0, E2 = C18:1n-7/C16:1n-7				
a, b, c, d Dentro de una columna y factor, las medias con superíndices distintos difieren significativamente (P<0.05)				

La **Tabla 3** refleja la correlación fenotípica entre los índices desaturasa y elongasa según tejido. Los índices SCD1 y SCD2 se encuentran positivamente correlacionados en todos los

tejidos, de la misma forma que lo están E1 y E2. Por el contrario, las correlaciones entre los índices SCD y los E son negativas. Es interesante resaltar la correlación desfavorable y alta entre SCD2 y E1, ya que ello sugiere que un aumento de la actividad desaturasa en el paso de ácido esteárico (C18:0) a oleico (C18:1n-9), podría verse limitada por la biosíntesis del esteárico (C18:0) a partir de palmítico (C16:0).

Tabla 3. Correlación fenotípica entre los índices desaturasa y elongasa según tejido

Índices		Tejidos			
		Hígado	GM	GS	SM
SCD2	SCD1	0.89*	0.49*	0.71*	0.44*
E1	SCD1	-0.88*	-0.63*	-0.89*	-0.59*
E1	SCD2	-0.93*	-0.87*	-0.75*	-0.74*
E2	SCD1	-0.79*	-0.63*	-0.66*	-0.63*
E2	SCD2	-0.71*	-0.45*	-0.09	0.2
E2	E1	0.78*	0.69*	0.59*	0.29

*(P<0.05)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bosch, L., Tor, M., Reixach, J. & Estany J. 2009. *Meat Sci.* 82:432-437
- Cameron, N., Enser, M., Nute, G., Whittington, F., Penman, J., Fiskén, A., Perry, A. & Wood, J. 2000. *Meat Sci.* 55:187-195
- Cánovas, A., Estany, J., Tor, M., Pena, R. & Doran, O. 2009. *J. Anim. Sci.* 87:3905-3914
- Doran, O., Moule, S., Teye, G., Whittington, F., Hallett, K. & Wood, J. 2006. *Brit. J. Nutr.* 95:609-617
- Miyazaki, M & Ntambi, J. 2003. *Prostag. Leukotr. E.S.S.* 68:113-121
- Muñoz, R., Estany, J., Tor, M. & Doran, O. 2013. *Meat Sci.* 93:746-751
- Ren, J., Knorr, C., Huang, L. & Brenig, B. 2004. *Gene.* 340:19-30
- Ros-Freixedes, R., Reixach, J., Tor, M & Estany, J. 2012. *J. Anim. Sci.* 90:4230-4238
- Wood, J., Richardson, R., Nute, G., Fisher, A., Campo, M., Kasapidou, E., Sheard, P. & Enser, M. 2003. *Meat Sci.* 66:21-32.

Agradecimientos: Proyecto financiado por el MICINN (AGL2009-09779). Eliana Henríquez agradece la beca del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza. R. Ros-Freixedes es beneficiario de una beca FPI (BES-2010-034607).

DESATURASE AND ELONGASE ACTIVITY ACROSS TISSUES AND GENOTYPES IN DUROC PIGS

ABSTRACT: Fat content and composition, particularly oleic acid (C18:1n-9), are two aspects that influence meat quality. The biosynthesis of C18:1n-9 depends on the stearoyl-CoA desaturase (SCD) and elongase (E) enzymes. The aim of the present study was to determine whether the activity of these enzymes differs across tissues and genotypes in Duroc pigs. Genotypes were based on the *AY487830:g.2281A>G* polymorphism of the *SCD* gene. The SCD related-ratios {SCD1=C16:1n-7/C16:0; SCD2=C18:1n-9/C18:0} were greater in muscle than in subcutaneous fat and liver, confirming that SCD activity is tissue-specific. The elongase ratios {E1=C18:0/C16:0; E2=C18:1n-7/C16:1n-7} were greater in liver and subcutaneous fat than in muscle. The AA genotype had higher activity for SCD but not for E. The correlations between SCD ratios, as well as those between E ratios, were positive in all tissues. By contrast, the correlations between SCD and E ratios were negative.

Keywords: intramuscular fat; fat composition; pigs; stearoyl-CoA desaturase

ASOCIACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN *PLIN2* CON CARACTERES DE CRECIMIENTO EN CERDOS DUROC

Gol, S.^{1,2}, Ros-Freixedes, R.¹, Bigi, M.², Braglia, S.², Tor, M.¹,
Pena, R. N.¹, Estany, J.¹ y Davoli, R.²

¹ Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida, 25198 Lleida

² DISTAL Department of Agricultural and Food Science, Università di Bologna, 42100 Italy.
jestany@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

Las perilipinas (PLIN) son una familia de proteínas localizadas en la membrana de las vacuolas lipídicas intracelulares (Greenberg et al., 1991). Los genes *PLIN1* y *PLIN2*, como miembros principales, ejercen un papel importante en la regulación de la lipólisis permitiendo o restringiendo el acceso de las lipasas al interior de las vacuolas lipídicas, donde se almacenan los triglicéridos (Brasaemle et al., 2000). En la especie porcina, *PLIN1* y *PLIN2* se localizan en los cromosomas 7 (Tao et al., 2008) y 1 (Kim et al., 2005) respectivamente, en regiones donde se han descrito QTLs con efecto sobre caracteres de crecimiento y de calidad de la carne. Gandolfi et al. (2011) confirmaron que ambos genes se expresan en el músculo esquelético del cerdo adulto. En un estudio previo, Davoli et al. (2010) observaron en Duroc Italiano que el polimorfismo sinónimo, situado en la región 3'UTR *GU46131:g.98G>A* de *PLIN2* estaba asociado con caracteres de la canal. El objetivo del presente trabajo ha sido explorar evidencias de asociación de los polimorfismos *JN860199:g.173G>A*, situado en el exón 2 de *PLIN1*, y *GU46131:g.98G>A* de *PLIN2* con el conjunto de caracteres productivos y de calidad de carne y grasa en una línea Duroc diferenciada genéticamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal. Se han utilizado 268 machos castrados Duroc procedentes de 137 hembras y 28 machos (Ros-Freixedes et al., 2012). A todos ellos se les controló el peso (P) y la grasa dorsal (GD) a los 120 y 205 días de edad. La GD se midió mediante ultrasonidos (*Piglog 105*) a la altura de la última costilla, a unos 5 cm de la línea media. Durante la prueba los cerdos se alimentaron ad libitum con dietas comerciales y se sacrificaron a los 210 días de edad. A todos ellos se les registró el peso (PC), grasa dorsal (GDC) y la longitud (LC) de la canal, medida desde la primera costilla hasta el extremo anterior de la sínfisis pubiana, así como el porcentaje de magro (MC) estimado mediante un equipo AutoFOM. El peso de magro de la canal (PMC) se estimó a partir de PC y MC. Después de 24 h a 2^o C, se pesó el jamón izquierdo (PJ) y se extrajo una muestra representativa de los músculos *gluteus medius* (GM) y *longissimus dorsi* (LM). En ambos músculos se determinó el contenido de grasa intramuscular (GIMGM y GIMLM, respectivamente) de acuerdo con la metodología descrita en Bosch et al (2009). El número de animales y caracteres analizado en este experimento se detalla en la Tabla 1.

Genotipado. El ADN de estos animales fue extraído a partir de muestras de sangre mediante un protocolo estándar. Se determinó el genotipo para dos SNP, uno en el gen *PLIN1* y otro en el *PLIN2*. El SNP *JN860199:g.173G>A* de *PLIN1* fue genotipado mediante una PCR-RFLP con la enzima *NalIII*, mientras que el SNP *GU46131:g.98G>A* de *PLIN2*, se genotipó mediante qPCR a tiempo real (SYBR green), usando el análisis High Resolution Melt, del instrumento Rotor gene 6000 (Corbett) (Davoli et al., 2010).

Tabla 1. Número de cerdos, media y desviación estándar (DT) de los caracteres analizados

Carácter ¹	n	Media	DT
P120d, kg	268	62.13	9.71
P205d, kg	268	123.96	9.66
PC, kg	265	94.06	7.56
GD120d, mm	268	11.41	3.03
GDC, mm	247	21.97	3.66
LC, cm	265	86.39	2.73
MC,%	247	44.50	5.00
PMC, kg	247	41.60	4.96
PJ, kg	266	12.28	1.10
GIMGM, %ms	268	15.63	5.09
GIMLM, %ms	131	10.51	3.02

¹ Abreviaciones en el texto

Análisis de asociación. Las diferencias entre genotipos se analizaron mediante metodología bayesiana utilizando un modelo animal que incluyó, como factores sistemáticos, el genotipo (3 niveles), el lote (3 niveles) y la covariable edad. Los efectos aditivo y dominante asociados a cada genotipo se contrastaron reemplazando el efecto del genotipo por las covariables X_a y X_d , codificadas como (1, 0, -1) y (0, 1, 0) para el homocigoto más frecuente, el heterocigoto y el homocigoto menos frecuente, respectivamente. El modelo se resolvió usando el programa TM (Legarra et al., 2008) y las muestras se derivaron de muestras extraídas de la distribución marginal posterior usando una cadena de 500,000 iteraciones, descartando las 100,000 primeras y reteniendo una de cada 100. El cálculo de los estadísticos de la distribución marginal se hizo mediante el paquete BOA (Smith, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La distribución de los animales por genotipo se indica en la Tabla 2. El alelo A presentó una frecuencia génica de 0.70 en *PLIN1* y de 0.57 en *PLIN2*, por lo que ambos SNP segregan en la población Duroc estudiada.

Tabla 2. Número de cerdos (n) y frecuencia genotípica para *PLIN1* y *PLIN2*

Polimorfismo	n	Frecuencia genotípica		
		AA	AG	GG
<i>PLIN1</i> (JN860199:g.173G>A)	268	0.19	0.48	0.32
<i>PLIN2</i> (GU46131:g.98G>A)	261	0.09	0.42	0.49

A pesar de que distintos estudios en humano y ratón indican correlación de *PLIN1* con el peso corporal (Qi et al., 2004; Tansey et al., 2001), los análisis llevados a cabo en el presente trabajo no muestran evidencia de asociación entre el SNP en *PLIN1* y los caracteres analizados (datos no mostrados). Sin embargo, sí se encontraron asociaciones entre el SNP de *PLIN2* y los caracteres de crecimiento y de la calidad de la carne (Tabla 3). En particular, el alelo A afectó favorablemente y de forma aditiva el peso vivo, aunque su efecto fue menor con la edad (2.00, 1.62, y 1.37 kg, para P120d, P205d y PC, respectivamente). De forma correlativa, el alelo A se asocia a un aumento de LC (0.56 cm), PJ (0.13 kg) y PMC (0.90 kg). Estos resultados son consistentes con los encontrados para este mismo SNP en una población de Duroc Italiano (Davoli et al., 2010).

Tabla 3 Efecto del SNP GU46131:g.98G>A de PLIN2 en los caracteres analizados.

Carácter ¹	Diferencias entre genotipos				Efectos aditivo (a) y dominante (d)			
	AA-AG	P(>0) ²	AA-GG	P(>0) ²	a	P(>0) ²	d	P(>0) ²
P120d, kg	0.98	0.82	3.92	>0.99	2.00	>0.99	1.16	0.90
P205d, kg	0.18	0.56	3.43	0.98	1.62	0.95	1.16	0.81
PC, kg	-0.41	0.38	2.55	0.94	1.27	0.94	1.61	0.92
GD120d, mm	0.14	0.67	0.63	0.95	0.31	0.95	0.12	0.67
GDC, mm	-0.52	0.15	-0.59	0.17	-0.31	0.16	0.23	0.69
LC, cm	0.16	0.65	1.24	0.99	0.56	0.98	0.28	0.77
MC,%	0.01	0.51	1.17	0.88	0.69	0.91	0.76	0.87
PMC, kg	0.33	0.66	1.80	0.97	0.90	0.97	0.54	0.79
PJ, kg	0.17	0.87	0.26	0.91	0.13	0.98	-0.03	0.42
GIMGM, %ms	-0.42	0.06	-0.40	0.10	-0.20	0.10	0.24	0.86
GIMLM, %ms	-1.17	<0.01	-0.57	0.04	-0.24	0.08	1.02	>0.99

¹ Abreviaciones en el texto. ² P>0: Probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero.

Los efectos del SNP en *PLIN2* no fueron tan evidentes sobre el contenido graso. En este caso, si bien el alelo A incrementó GD120d (0.31 mm; P(>0)= 0.95) en G, no afectó GDC (-0.34 mm, P(>0)= 0.16). Este último resultado podría explicar porque el alelo A tiende a disminuir GIMGM (-0.20%; P(>0)= 0.10) y GIMLM (-0.24%; P(>0)= 0.08). Los resultados obtenidos indican que el SNP de *PLIN2* podría ser un marcador útil en Duroc para la mejora de los caracteres de crecimiento y canal a edades jóvenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bosch, L. et al. 2012. *Meat Sci.* 91: 358-363. • Brasaemle, D. et al. 2000. *J Biol Chem.* 275: 38486-38493. • Davoli, R. et al. 2010. *Mol Biol Rep* 6: 419-440 • Gandolfi, G. et al. 2011. *Meat Sci.* 88: 631-637. • Greenberg, A. S. et al. 1991. *J Biol Chem.* 266: 11341-11346. • Kim, T. H. et al. 2005. *J Anim Gen.* 122: 240- 246. • Legarra, A. et al. 2008. *Manual TM* <http://cat.toulouse.inra.fr/~alegarra/> • Qi, L. et al. 2004. *Clin Gen.* 66: 299-310 • Ros-Freixedes, R. et al. 2012. *J Animal Sci.* 90: 4230-4238. • Smith, B.J. 2005. <http://www.public-health.uiowa.edu/boa/> • Tansey, J. T. et al. 2003. *J Biol Chem.* 278: 8401-6 • Tao, X. et al. 2008. *Genet Sel Evol.* 40: 215–226.

Agradecimientos: Proyecto financiado por el MICINN (AGL2009-09779). R.Ros-Freixedes es beneficiario de una beca de doctorado del MICINN (BES-2010-034607).

PERILIPIN-2 GENE POLYMORPHISM IS ASSOCIATED TO BODY WEIGHT IN DUROC PIGS

ABSTRACT: Perilipin (PLIN) family members are located in the membrane of lipid droplets and play a role regulating lipolysis. In this study a SNP in exon 2 of the *PLIN1* gene (GU461315:G.184G>A) and a SNP at the 3' UTR region of the *PLIN2* gene (GU461317:G.98G>A) were evaluated as candidates for an association analysis with growth and carcass traits in pigs. A total of 268 pedigree-referenced Duroc barrows were genotyped. No evidence of association was found for the SNP at *PLIN1* but the SNP at *PLIN2* proved to be consistently associated to growth and carcass traits, predominantly at earlier ages. In particular, allele A had a probability greater than 0.95 of having a positive additive effect on live body weight (2.0 kg) and backfat thickness (0.31 mm), as well as on carcass lean growth at 205d (0.90 kg) and ham weight (0.13 kg). By contrast, allele A is significantly associated to decrease the intramuscular fat content, both in the *gluteus medius* and *longissimus dorsi* muscles. Thus, It is concluded that the SNP GU461317:G.98G>A at *PLIN2* can be a potential useful marker for growth and carcass traits in Duroc.

Keywords: growth; meat quality; perilipin; pig.

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN GRASA DORSAL EN UN CRUCE IBÉRICO X LANDRACE CON UN CHIP DE 144 SNPs DEL SSC8

Revilla, M.¹, Ramayo-Caldas, Y.^{1,2}, Castelló, A.¹, Corominas, J.^{1,2}, Puig-Oliveras, A.^{1,2}, Ibáñez-Escriche, N.³, Muñoz, M.⁴, Ballester, M.¹, Folch, J.M.^{1,2}

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra, 08193. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ³Genètica i Millora Animal, IRTA, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida. ⁴Departamento Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. Coruña Km 7.5, 28040 Madrid.

E-mail: manuel.revilla@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

El contenido y composición de ácidos grasos en porcino resulta un parámetro de creciente interés por su efecto sobre el rendimiento de la canal y la calidad de la carne. En un cruce F2 Ibérico x Landrace se identificó (Clou *et al.*, 2003) un QTL en el cromosoma 8 porcino (SSC8) para el porcentaje de los ácidos grasos palmítico y palmitoleico y para la longitud media de los ácidos grasos en grasa dorsal. Recientemente, se ha realizado un análisis de asociación genómico (GWAS) (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012) con los datos genotípicos del chip de 60 K SNPs de *Illumina* y la composición de ácidos grasos en músculo (*Longissimus dorsi*) en 144 animales del retrocruce BC1_LD (25% Ibérico, 75% Landrace). Este estudio ha permitido refinar la posición del QTL del SSC8 e identificar el gen *ELOVL6* como potente candidato posicional y funcional. *ELOVL6* está implicado en la lipogénesis *de novo*, actuando en la elongación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Un polimorfismo en la región promotora de este gen (*ELOVL6*:c.-533C>T) está asociado con el porcentaje de palmítico y palmitoleico en músculo y tejido adiposo (Corominas *et al.*, 2013). Animales con un genotipo diferente para el polimorfismo *ELOVL6*:c.-533C>T, mostraron diferencias de expresión del gen *ELOVL6* en tejido adiposo, donde una menor expresión del gen resultó en un mayor porcentaje de palmítico y palmitoleico en músculo y tejido adiposo, en concordancia con la función del gen (Corominas *et al.*, 2013). El objetivo del presente trabajo es estudiar el QTL del SSC8 para la composición de ácidos grasos en grasa dorsal en la generación F2 del cruce IBCMAP con un panel refinado de 144 SNPs informativos distribuidos a lo largo del SSC8.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y fenotipos: El material animal utilizado procede del cruce IBCMAP, generado por el cruce inicial de verracos Ibéricos Guadyerbas y cerdas Landrace (Pérez-Enciso *et al.* 2000). Se analizaron un total de 470 animales F2 procedentes del cruce de 6 machos y 67 hembras F1. En el estudio de asociación se incluyeron los datos de composición de 20 ácidos grasos en grasa dorsal, en el rango del C12:0 al C22:0 (Clou *et al.*, 2003). También se realizaron estudios de asociación por familias de medios hermanos paternos. Para el análisis se utilizaron 426 animales pertenecientes a las 4 familias con mayor número de descendientes.

Genotipado y control de calidad. Se determinó el genotipo de un total de 144 SNPs del SSC8 en 470 animales mediante la metodología de *GoldenGate* en un chip *VeraCode (Illumina)* donde se incluyeron 142 SNPs del *Porcine SNP60K BeadChip (Illumina)* y 2 SNPs de genes candidatos: *MTTP* (Estellé *et al.*, 2009) y *FABP2* (Estellé *et al.*, 2009). Utilizando el programa *Plink* (Purcell *et al.*, 2007), se actualizaron las coordenadas genómicas de los SNPs (*Sscrofa10.2*). Posteriormente, se eliminaron los SNPs con problemas de asignación de genotipos (*cluster analysis* de *GenomeStudio*,

Illumina) y con una frecuencia del alelo minoritario (MAF) inferior al 5 %. Finalmente, se obtuvieron un total de 133 SNPs informativos.

Modelo estadístico: El análisis de asociación fue realizado con la nueva versión del programa *Qxpak5* (Pérez-Enciso y Misztal, 2011). Todos los fenotipos fueron analizados bajo el siguiente modelo:

$$y_{ijklkm} = \text{Sexo}_i + \text{Lote}_j + \beta c_i + \lambda_{ik} a_k + \mu_i + e_{ijklkm}$$

Donde y_{ijklkm} es el valor fenotípico de cada individuo

Sexo_i : sexo del individuo con 2 niveles $i=1,2$ (definido como efecto fijo)

Lote_j : Lote del individuo con 5 niveles $j=1, 2, 3, 4, 5$ (definido como efecto fijo)

β : Coeficiente de covariable

c_i : Peso de la canal de cada individuo

λ_{ik} corresponde al genotipo del SNP k para el individuo i , siendo $\lambda = -1$ (aa), 0 (Aa), $+1$ (AA)

a_k : es el efecto aditivo de sustitución alélica del SNP k

μ_i : Efecto infinitesimal que se distribuye como $N(0, \mathbf{A} \sigma^2_u)$

\mathbf{A} : Matriz de parentesco

σ^2_u : varianza genética aditiva

e_{ijklkm} : residuo

Los p -valores obtenidos fueron corregidos utilizando la librería de R q -value (Storey *et al.*, 2004) considerando significativos aquellos SNPs que mostraron un q -value $< 0,05$. La versión 2.15.2 de R (*R Development Core Team*, 2008) fue utilizada para calcular los estadísticos descriptivos para los 20 caracteres analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer objetivo fue diseñar un chip con aquellos SNPs que presentaban una máxima informatividad, distribuidos uniformemente a lo largo del SSC8. Posteriormente, se realizó un estudio de asociación con 133 SNPs informativos y 470 animales F2. Se observaron asociaciones significativas en el 50% de los ácidos grasos estudiados (10/20) incluyendo los descritos previamente en grasa dorsal (Clop *et al.*, 2003): C16:0, C16:1 (n-7) y ACL. El genotipado de nuevos marcadores distribuidos a lo largo del SSC8 ha permitido identificar nuevos QTLs (C16:1 y C18:0) en regiones genómicas poco cubiertas en los análisis anteriores con microsatélites (C14:0, C18:1 (n-9), C18:0). Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos recientemente en grasa intramuscular en un retrocruce de la población experimental ILMAP (BC1_LD) (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012), siendo la región 117,4-121,0 Mb del SSC8 la más asociada a los ácidos grasos C16:1 (n-7) y C16:0. En esta región se localiza el gen *ELOVL6*. Estos resultados refuerzan la hipótesis de un QTL con efecto pleiotrópico sobre el perfil de estos ácidos grasos en grasa dorsal y en músculo.

En el análisis por familias se obtuvieron asociaciones significativas en el 80% de los ácidos grasos estudiados, observándose una fuerte asociación en el SSC8 con el ácido palmítico en las cuatro familias estudiadas (*Figura 1*). Cabe destacar la detección en algunas de las familias de una región localizada en la posición 92,7-93,2 Mb y asociada con C16:0, C16:1, C18:0, C18:1(n-9), ACL, C18:1/C16:1, C16:1/C16:0 y C18:0/C16:0. En esta región se encuentran los genes *SETD7* y *MAML3*. El gen *SETD7* desempeña un papel central en la activación transcripcional de genes como la colagenasa o la insulina. El gen *MAML3* actúa como un coactivador transcripcional de las proteínas NOTCH. Los resultados sugieren la presencia de dos QTLs del SSC8 para la composición de ácidos grasos en grasa dorsal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Clop *et al.* 2003. *Mamm. Genome* 14(9): 650-6. • Y. Ramayo-Caldas *et al.* 2011. XIV Jornadas sobre Producción animal, Zaragoza 17-18 Mayo. • Y. Ramayo-Caldas *et al.*

2012. Journal of Animal Science. • Jordi Corominas *et al.* 2013. Plos One 8(1). • Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2011. Bioinformatics. • J. Estellé *et al.* 2009 Journal of Animal Breeding and Genetics, 126: 52–58. • J. Estellé *et al.* 2009 Animal Genetics, 40: 813–820. • R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos MICINN AGL2008-04818-C03/GAN y MINECO AGL2011-29821-C02 y por el Programa de Innovación Consolider-Ingenio 2010 (CSD2007-00036). M. Revilla es estudiante del Máster Interuniversitario Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción (Universidad Politécnica de Valencia y Universidad Autónoma de Barcelona). Y. Ramayo-Caldas ha sido financiado con una beca FPU (AP2008-01450), J. Corominas con la beca FPI del Ministerio de Educación (BES-2009-018223) y A. Puig-Oliveras con una beca PIF (458-01-1/2011).

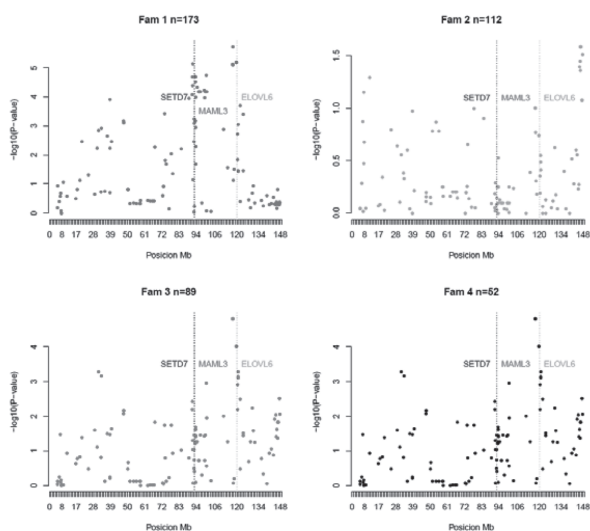


Figura 1: Análisis de asociación por familias para el contenido de C16:0 en grasa dorsal. Las posiciones en Mb son relativas a *Sscrofa10.2*. Las líneas verticales discontinuas indican la ubicación de genes candidatos posicionales.

ASSOCIATION STUDY FOR BACKFAT FATTY ACID COMPOSITION IN AN IBERIAN X LANDRACE CROSS WITH A 144 SNP CHIP OF SSC8

ABSTRACT: An association study for backfat fatty acid composition with the genotypes of 144 SNP of SSC8 was performed. Twenty traits, related with fatty acid composition and index of fatty acid metabolism in backfat, were analyzed. A total of 470 F2 animals from an Iberian x Landrace cross (IBMAP) were genotyped. After quality control, a total of 133 informative SNPs were retained. Two QTLs were found in the association analysis. The QTL in the 117.4-121.0 Mb region was in concordance with a previously identified QTL for intramuscular fatty acid composition, where *ELOVL6* is a strong candidate gene. An additional QTL, confirmed in an analysis of families, was found in 92.7 to 93.2 Mb position, where *SETD7* and *MAML3* genes are located.

Keywords: pig, adipose tissue, QTL.

ANÁLISIS DE CANALIZACIÓN SOBRE EL PESO AL NACIMIENTO EN LA RAZA BRUNA DELS PIRINEUS

Fina, M¹., Ibáñez-Escriche, N²., Piedrafita, J¹. y Casellas, J¹.

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

²Genètica i Millora Animal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, 25198 Lleida. marta.fina@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El peso al nacimiento (PN) es uno de los objetivos de selección en la raza bovina *Bruna dels Pirineus*, en donde los pesos extremos se prefieren evitar para prevenir posibles casos de distocia (en terneros demasiado pesados) o baja viabilidad neonatal (en terneros demasiado ligeros; Tarrés et al., 2005). En relación a la heterogeneidad de la varianza residual, hay estudios de peso en bovinos de carne que evidencian su existencia (Robert-Granié et al., 1999), así como en otros caracteres y especies ganaderas. Por ejemplo, en el tamaño de camada y peso al matadero en cerdos (Sorensen y Waagepetersen, 2003; Ibáñez-Escriche et al., 2007), peso adulto en pollos (Rowe et al., 2006), prolificidad en ovejas (SanCristobal-Gaudy et al., 2001), y caracteres lecheros (Robert-Granié et al., 1999). Por otra parte, cabe destacar, que muchos de estos estudios se realizaron con los modelos desarrollados por SanCristobal-Gaudy et al. (1998) y Sorensen y Waagepetersen (2003), los cuales asumen contribución genética sobre la variabilidad ambiental (canalización). El principal objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de efectos genéticos aditivos que influyen en la variación residual del PN en la raza *Bruna dels Pirineus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio ha sido realizado sobre 8.130 datos de (PN) registrados durante el periodo 1989-2010, pertenecientes a 12 explotaciones conectadas genealógicamente y que participaban en el Programa de Control de Rendimientos y Mejora Genética de la *Bruna dels Pirineus*. El pedigrí incluyó 10.266 animales, de los cuales 2.671 eran madres y 230 padres de animales con información fenotípica. El PN se analizó bajo dos modelos, el de varianzas homogéneas (HO) y el modelo de varianzas heterogéneas (HE) presentado a continuación:

$$y_i = \mathbf{x}_i' \mathbf{b} + \mathbf{w}_i' \mathbf{p} + \mathbf{z}_i' \mathbf{a} + \exp\left(\frac{\mathbf{x}_i' \boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\omega}_i' \boldsymbol{\pi} + \boldsymbol{\zeta}_i' \boldsymbol{\alpha}}{2}\right) \boldsymbol{\varepsilon}_i$$

donde \mathbf{b} y $\boldsymbol{\beta}$ son los vectores de parámetros asociados con los efectos fijos de edad de la madre (6 niveles), tipo de parto (simple o doble), sexo del ternero (macho o hembra) y el efecto rebaño-año-estación (135 niveles), \mathbf{p} y $\boldsymbol{\pi}$ son los vectores de parámetros asociados a los efectos ambientales permanentes, y \mathbf{a} y $\boldsymbol{\alpha}$ son los vectores de parámetros asociados al efecto genético aditivo infinitesimal. Nótese que \mathbf{x}_i , \mathbf{w}_i , \mathbf{z}_i , $\boldsymbol{\chi}_i$, $\boldsymbol{\omega}_i$, $\boldsymbol{\zeta}_i$ son los vectores de incidencias correspondientes.

Bajo una aproximación Bayesiana estándar, se asignó una normal multivariante como distribución a priori para los efectos genéticos aditivos (\mathbf{a} y $\boldsymbol{\alpha}$),

$$\begin{pmatrix} \mathbf{a} \\ \boldsymbol{\alpha} \end{pmatrix} \sim N\left(\begin{pmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \end{pmatrix}, \begin{bmatrix} \sigma_a^2 & \rho \sigma_a \sigma_\alpha \\ \rho \sigma_a \sigma_\alpha & \sigma_\alpha^2 \end{bmatrix} \otimes \mathbf{A}\right),$$

donde $\mathbf{0}$ era un vector de ceros de dimensiones iguales al número de individuos del pedigrí, \mathbf{A} era la matriz de relaciones genéticas aditivas, σ_a^2 era la varianza genética directa del carácter, σ_α^2 era la varianza genética aditiva de la variabilidad residual, ρ era el coeficiente de correlación genética, y \otimes representaba el producto de Kronecker. Los vectores \mathbf{p} y $\boldsymbol{\pi}$ se asumieron independientes con a prioris $\mathbf{p} | \sigma_p^2 = N(\mathbf{0}, \mathbf{I}_p \sigma_p^2)$ y $\boldsymbol{\pi} | \sigma_\pi^2 = N(\mathbf{0}, \mathbf{I}_\pi \sigma_\pi^2)$ donde \mathbf{I}_p y \mathbf{I}_π eran matrices de incidencia de dimensiones iguales que los vectores \mathbf{p} y $\boldsymbol{\pi}$, respectivamente, y σ_p^2 y σ_π^2 eran las varianzas ambientales permanentes que afectaban al carácter y a la log-varianza, respectivamente. La heredabilidad no puede ser reducida a un único valor porque la varianza residual cambia a lo largo de los niveles de los efectos

sistemáticos (Ros et al., 2004; Ibáñez-Escriche, 2008). En este contexto, se aproximó siguiendo la expresión,

$$h_i^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_p^2 + \exp(\mathbf{x}_i'\boldsymbol{\beta} + \sigma_\alpha^2/2 + \sigma_\pi^2/2)}$$

Los modelos descritos se analizaron con el software GSEVM de Ibáñez-Escriche et al. (2010), lanzando tres cadenas de muestreo de 5.050.000 iteraciones y descartando las 50.000 primeras como *burn in*. Los modelos se compararon mediante el *deviance information criterion* (DIC) desarrollado por Spiegelhalter et al. (2002) y se aplicó una aproximación de *step-wise* para identificar los efectos significativos en el término residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del DIC descartaron el modelo de varianzas homogéneas y las fuentes de heterogeneidad vinieron caracterizadas tanto por efectos sistemáticos como aleatorios. De hecho, la inclusión de $\boldsymbol{\pi}$ y $\boldsymbol{\alpha}$ redujo substancialmente el DIC, y también el rebaño-año-estación y el tipo de parto fueron relevantes (Tabla 1). Los efectos sistemáticos de sexo y edad de la madre no fueron relevantes, contrariamente a los resultados descritos anteriormente en vacuno por Kizilkaya y Templeman (2005) o en cerdos por Ibáñez-Escriche et al. (2007). Los resultados de los componentes de varianzas están representados en la Tabla 2. Ambos modelos presentaron similar σ_a^2 (5,88 kg² vs 6,42 kg², respectivamente) pero diferencias importantes en σ_p^2 (0,70 kg² en el modelo HE y 1,58 kg² en el modelo HO).

Los dos modelos daban como resultados heredabilidades parecidas (HO con $h^2 = 0,30$; HE con $h^2 = 0,27$), aunque menores que las descritas en otras razas bovinas cárnicas españolas como la Asturiana de los Valles ($h^2 = 0,39$; Gutiérrez et al. 2007) o europeas como la Charolais ($h^2 = 0,46$; Mujibi y Crews, 2009). Los resultados permitieron identificar los toros que proporcionaron una progenie más homogénea con un efecto genético directo intermedio, los cuales deberían ser utilizados preferentemente como progenitores para las generaciones futuras de terneros. Además, observaciones relativas a la tendencia genética permitirían la posibilidad de mejorar las características de crecimiento, lo cual podría usarse como herramienta para aumentar la comercialización y el precio de los animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gutiérrez, J. P., Goyache, F., Fernández, I., Alvarez, I., & Royo, L. J. 2007. J. Anim. Sci. 85:69-75.
- Ibáñez-Escriche, N., Varona, L., Sorensen, D., & Noguera, J.L. 2007. Animal 2:19-26.
- Ibáñez-Escriche, N., Sorensen, D., Waagepetersen, R., & Blasco, A. 2008. Genetics 180:2209-2226.
- Ibáñez-Escriche, N., García, M., & Sorensen, D. 2010 J. Anim. Breed. Genet. 127: 249-51.
- Kizilkaya, K., & Tempelman, R. J. 2005. Genet. Sel. Evol. 37:31-436 56.
- Mujibi, F.D.N., & Crews, D.H. 2009. J. Anim. Sci. 87:2759-2766.
- Robert-Granié, C., Bonaiti, B., Boichard, D., & Barbat, A. 1999. Livest. Prod. Sci. 60:343-357.
- Rodríguez-Almeida, F.A., Van Vleck, L.D., Cundiff, L.V., & Kachman, S.D. 1995. J. Anim. Sci. 73:2579-2588.
- Rowe, S.J., White, I.M.S., Avendano, S., & Hill, W.G. 2006. Genet. Sel. Evol. 38 :617-635.
- Ros, M., Sorensen, D., Waagepetersen, R., Dupont-Nivet, M., SanCristobal, M., Bonnet, J. C., & Mallard, J. 2004. Genetics 168:2089-2097.
- SanCristobal-Gaudy, M., Elsen, J.M., Bodin, L., & Chevalet, C. 1998. Genet. Sel. Evol. 30:423-451.
- SanCristobal-Gaudy, M., Bodin, L., Elsen, J.M., & Chevalet, C. 2001. Genet. Sel. Evol. 33:249-271.
- Sorensen, D., & Waagepetersen, R. 2003. Genet. Res. 82:207-222.
- Tarrés, J., Casellas, J., & Piedrafita, J. 2005. J. Anim. Sci. 83:543-551.
- Spiegelhalter D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., & Van der Linde, A. 2002. J. R. Statist. Soc. B 64: 583-639.

Agradecimientos: Trabajo enmarcado dentro del Programa de Control de Rendimientos y Mejora Genética de la raza *Bruna dels Pirineus*, y financiado por el *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural*, con la inestimable aportación de los ganaderos de FEBRUPI que han registrado la información productiva.

T Rondas de step-wise mediante DIC (modelo heteroscedástico).

	Rondas de stepwise		
	1	2	3
Modelo base ¹			
Efectos	0	RAE	RAE + TP
DIC	2.920.305	2.603.536	2.482.593
Efectos contrastados			
Edad de la madre (EM)	2.912.759	2.671.208	2.500.636
Sexo del ternero (S)	2.884.956	2.524.370	2.616.098
Tipo de parto (TP)	2.921.794	2.482.593	
Rebaño-año-estación (RAE)	2.603.536		
Efecto seleccionado ²	RAE	TP	Ninguno

¹ Modelo obtenido en la iteración previa del *step-wise*. Este modelo tiene dos fuentes de variación aleatoria (efectos ambientales permanentes y genéticos aditivos).

² Efecto sistemático del modelo con un valor de DIC menor.

Tabla 2. Componentes de varianza para peso al nacimiento.

Componente de varianza ¹	Modelo HO ²		Modelo HE ³	
	Media	95% IC ⁵	Media	95% IC
σ_a^2	6,42	4,72 a 8,23	5,88	5,00 a 6,23
σ_a^{2a}	1,58	1,07 a 2,12	0,70	0,56 a 1,10
σ_p^2	13,22	12,14 a 14,28	-	-
σ_e^2	- ⁴	-	0,55	0,36 a 0,69
σ_π^2	-	-	0,20	0,12 a 0,30
ρ	-	-	0,40	0,37 a 0,54
h^2	0,30	0,23 a 0,38	0,30	0,19 a 0,40

¹ σ_a^2 (σ_a^{2a}): varianza genética aditiva directa (y residual); σ_p^2 (σ_π^2): varianza ambiental permanente (y residual); σ_e^2 : varianza residual; ρ : correlación genética; h^2 : heredabilidad (calculada asumiendo el efecto de partos simples y la media del efecto rebaño-año-estación). ² Modelo homoscedástico. ³ Modelo heteroscedástico. ⁴ No estimable. ⁵ Intervalo de credibilidad.

BIRTH WEIGHT CANALISATION IN BRUNA DELS PIRINEUS BEEF CATTLE BREED

ABSTRACT: Canalisation models have provided new understanding on animal breeding programs and, more specifically, heteroscedacity has become a particular topic of interest in beef cattle. For this reason, birth weight was analyzed in the *Bruna dels Pirineus* beef cattle breed by canalisation models. The analysis was performed on 8,130 BW records collected between 1989 and 2010 in twelve purebred herds. Analytical models accounted for direct additive genetic, permanent environmental and four systematic effects; the residual term accounted for the same effects and they were checked by the deviance information criterion; only residual additive genetic, permanent environment, birth type and herd-year-season remained in the final model. The heteroscedastic model provided moderate heritability (0.30) whereas additional additive genetic variability was revealed in the residual term, this being positively correlated with the direct additive genetic component (0.44). This study must be viewed as a contribution to the canalisation research field, providing relevant information for the breeding scheme of the *Bruna dels Pirineus* breed.

Keywords: beef cattle, Bayesian analysis, heterogeneous variance.

MARCADORES SNP ASOCIADOS A TERNEZA EN DOS MÚSCULOS, *Flexor Digitorum* y *Psoas Major*, EN AVILEÑA NEGRA IBÉRICA

Quintero-Arboleda, Ximena¹, Carabaño, M^a Jesús¹, Venturini, Guilherme², Meneses, Cristina¹, Rueda, Julia³, Díaz, Clara¹

¹Departamento de Mejora Genética Animal. INIA. ²Departamento de Mejora Genética FCAV-UNESP-Jaboticabal. Sao Paulo. Brasil ³Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid

Correo electrónico: cdiaz@inia.es

INTRODUCCIÓN

La mejora de la calidad de carne es actualmente uno de los objetivos principales para el sector de la producción de carne de vacuno (Díaz y Quintanilla, 2002). De acuerdo a la opinión de los consumidores, la terneza de la carne es uno de los componentes principales de la calidad sensorial de la misma (Martin-Collado y Díaz, 2012). Desde finales de la década de los 90 se ha realizado una búsqueda intensiva de QTLs en distintas razas de vacuno de carne y sus cruces (www.animalgenome.com). Sin embargo, la búsqueda de marcadores genéticos de calidad de la carne en la raza Avileña Negra-Ibérica (ANI), con sello de Identificación Geográfica Protegida, no ha sido igualmente intensa. En dicha raza se han realizado estudios desde hace unos años en dos músculos distintos para entender la base genética de las diferencias en calidad de carne (Díaz et al., 2009; Lopez de Maturana et al., 2009). Moreno-Sánchez et al. (2012) encontraron genes que se expresan diferencialmente (DE) entre los músculos *Psoas major* (PM) y *Flexor digitorum* (FD), que se han asociado a caracteres de calidad de carne en otras poblaciones (Reverter et al., 2008), o que se han localizado en posición QTL para calidad de carne (Moreno-Sánchez et al., 2012). Teniendo en cuenta que estos músculos son notablemente distintos desde el punto de vista histológico, metabólico y bioquímico (Moreno-Sánchez et al., 2008), es razonable pensar que hay una base genética que puede estar determinando diferencias entre ambos músculos para algunos caracteres como la terneza de la carne.

El objetivo de este trabajo es identificar marcadores genéticos relacionados con la terneza de la carne medida en dos músculos distintos (*PM* y *FD* en ANI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se han usado las siguientes fuentes de información:

- Posición en el mapa bovino de QTLs para terneza de carne publicados hasta la fecha, recopilados en la base de datos pública Animal Genome (www.animalgenome.org) bajo la versión UMD_3.1. Esta información fue utilizada para preseleccionar los SNPs participantes en el estudio asociación, que fueron aquellos contenidos en estas regiones QTL.
- Genotipado de 397 terneros de raza ANI realizado con la plataforma Illumina Bovine SNP50.
- Información fenotípica de terneza organoléptica y de compresión Warner-Blatzer o terneza instrumental después de siete días de maduración. Las medias y desviaciones estándar por músculo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de animales para los que se tienen datos fenotípicos. Medias y desviaciones típicas (dt) para cada músculo del conjunto de datos para cada carácter.

Caracteres Fenotípicos	<i>Flexor digitorum</i>		<i>Psoas major</i>	
	Nº de Animales	Media ± dt	Nº de animales	Media ± dt
Terneza instrumental	351	7,86±4,70	357	6,54±3,25
Terneza organoléptica	394	3,49±1,40	393	5,68±1,18

- El modelo usado para el análisis de asociación fue el siguiente:

$$y_{ijklm(no)pqr} = CbA_i + DCb_j + EdS_k + EpS_l + M_m + (SC_n + Ct_o) + gSNP_p + a_q + e_{ijklm(no)pqr}$$

donde CbA= Cebadero-Año, DCb=Duración del periodo de cebo, EdS=Edad al sacrificio, EpS=Época de sacrificio, M=Matadero, Ss/Ct=Sesión de cata/Catador (sólo para terneza organoléptica), gSNP=genotipo SNP, a=efecto poligénico, e=residuo. El análisis se llevó a cabo con el software QXpak 5.2 (Pérez-Enciso y Misztal, 2011)

Par fijar el umbral de significación para seleccionar los SNPs asociados a terneza en cada músculo se utilizó la tasa de falsos positivos (FDR) obtenida como: $FDR=(n \cdot p)/k$, donde n es el número total de SNPs incluidos en el análisis, p es el umbral del p-valor fijado a priori y k es el número de SNPs seleccionados dado el umbral establecido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio encontramos 4101 SNPs contenidos en los 140 QTLs descritos en www.animalgenome.com. De éstos, el 15.43% estaban fijados y/o presentaron un “call rate” por marcador <98%. Finalmente, tras esta depuración se utilizaron un total de 3468 SNPs.

Tabla 2. Número de SNPs (k) asociados a Terneza organoléptica e instrumental para distintos músculos y tasa de falsos positivos (FDR) asociada según distintos umbrales del p-valor.

P-valor	Terneza Organoléptica				Terneza Instrumental			
	Flexor digitorum		Psoas major		Flexor digitorum		Psoas major	
	k	FDR	k	FDR	k	FDR	k	FDR
$P < 0.01$	54	0,64	153	0,23	65	0,53	43	0,80
$P < 0.001$	9	0,38	8	0,43	17	0,20	4	0,87
$P < 0.0001$	3	0,12	0	0	5	0,07	0	0
$P < 0.00001$	1	0,03	0	0	2	0,02	0	0

En la Figura 1 se presentan el log de los p-valores junto con el umbral de significación fijado según el FDR correspondiente a un p valor menor que 10^{-5} para la terneza organoléptica (arriba) e instrumental (abajo), respectivamente.

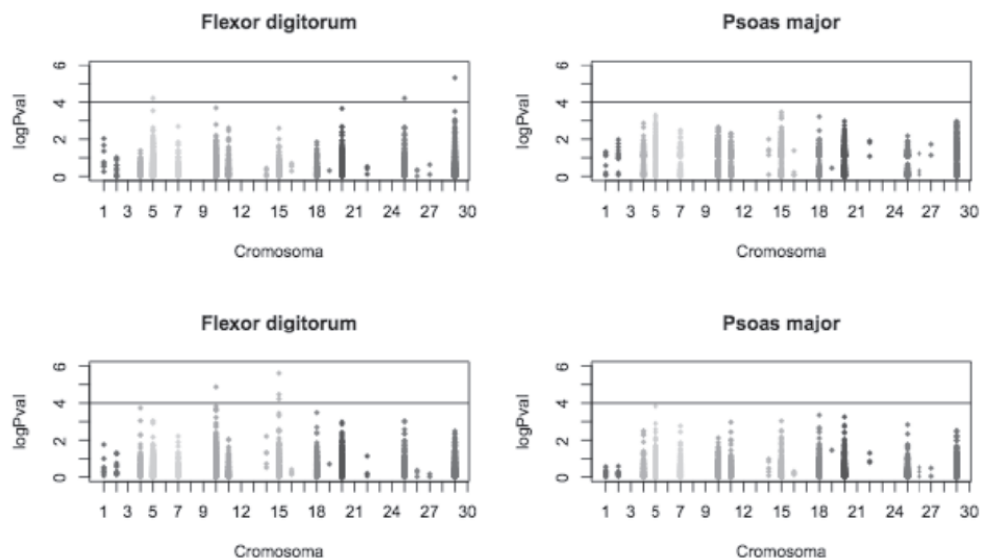


Fig.1. Manhattan plots para $-\text{Log}(\text{Pvalue})$ junto con el umbral de significación de acuerdo un $FDR \leq 12\%$. y efectos de los SNPs en cada músculo para terneza organoléptica (arriba) e instrumental (abajo)

Para el carácter terneza organoléptica se han identificado tres SNPs con un FDR=0.12, entre los cuales el SNP de mayor efecto explica el 7% de la varianza aditiva en el músculo FD y ningún SNP asociado a este carácter en el PM con el mismo nivel de FDR. En cuanto a terneza instrumental se han identificado 5 SNPs con un FDR=0.07, de los cuales el SNP de mayor efecto explicaría alrededor de un 32% de la varianza para este carácter en el músculo FD. Al igual que para terneza organoléptica, no se identificaron SNPs para el PM. Los resultados sugieren que podría existir un patrón diferencial entre ambos músculos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su contribución en la toma de muestras a la AECRANI y al Consejo Regulador de Carne de Ávila. Este estudio está financiado por el programa NEWGAN-CAM

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Díaz C. y Quintanilla R., 2002. ITEA. Producción Animal 98: 118; López de Maturana E., Carabaño, M.J., García-Cachán, M.D., Díaz, C., 2009. 60th EAAP. Barcelona, España; Martín-Collado D. y Díaz C., 2012. 63th. EAAP. Bratislava. Eslovaquia; Moreno-Sánchez, N., Díaz, C., Carabaño, MJ, Rueda, J and Rivero, JL. 2008. BMC Cell Biol 9: 67; Moreno-Sánchez N., Rueda J., Reverter A., Carabaño M. J., Díaz C., 2012. Functional & Integrative Genomics 12:93. Pérez-Enciso, M y Misztal, I. 2011. Bioinformatics. 12:202; Reverter A., Chan E. K. F., Lehnert S. A., Barris W., McWilliam S. M., Dalrymple B., Barendse W., 2008. Aus J Exp Agric 48: 1053.

SNPs MARKERS ASSOCIATED TO TENDERNESS IN TWO DIFFERENT MUSCLES *Flexor Digitorum* AND *Psoas Major*, IN AVILEÑA NEGRA IBÉRICA BREED

ABSTRACT: This study aimed at identifying genetic markers associated with beef tenderness in two largely different muscles, *Psoas major* (PM) en *Flexor digitorum* (FD). A total of 397 Avileña-Negra Ibérica calves with genotypes for the Illumina Bovine SNP50 platform and measures of organoleptic tenderness (OT) and Warner-Blazter compression (WBC) participated in the study. A pre-selection of SNPs was carried out by determining the SNPs contained in 140 QTL regions previously identified as associated with beef tenderness in the Animal Genome UMD_3.1 database. A genome wide association study (GWAS) was then performed using QXpak 5.2. A model including place-year and length of fattening, age, place and season of slaughter, panel session and panelist (only for OT), one SNP at a time and the polygenic additive effect was used. A total of 4101 SNPs were pre-selected. The GWAS revealed that 3/0 and 5/0 SNPs were associated to OT and WBC in FD/PM for a 12 and a 7 % FDR threshold, respectively. The SNP of largest effect was responsible for a of 7% and 32% of the total additive genetic variance of OT and WBC in FD, respectively. These results suggest a differential pattern of genetic regulation of tenderness between the two muscles.

Keywords: Tenderness, SNP, muscles.

BARRIDO GENÓMICO CON EL SNP-CHIP OVINO 50K PARA LA DETECCIÓN DE QTL CON INFLUENCIA SOBRE LA RESISTENCIA A NEMATODOS INTESTINALES EN EL GANADO OVINO DE RAZA CHURRA: ANÁLISIS DE LIGAMIENTO PARA EL RECUESTO DE HUEVOS EN HECES

Atlija¹, M., Gutierrez-Gil¹, B., Martinez Valladares², M., de la Fuente¹, L. F., Arranz¹, J. J.
¹ Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. ²Instituto de Ganadería de Montaña. CSIC-ULE, 24346 Grulleros, León.
e-mail: matl@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (GIN) en el ganado ovino siguen siendo una de las enfermedades parasitarias más prevalentes en el ganado ovino, causando importantes pérdidas económicas debido a sus efectos negativos sobre el crecimiento en corderos y la producción de leche en ovejas adultas. El control de GIN en rumiantes se basa en gran medida en el uso de fármacos antihelmínticos en combinación con estrategias de manejo de las zonas de pastoreo. El incremento en la prevalencia de la resistencia parasitaria a los antihelmínticos ha llevado, en los últimos años, a la búsqueda de métodos de controles alternativos entre los cuales cabe destacar la selección genética hacia una mayor resistencia de los animales a estas infecciones parasitarias. Existen varios fenotipos asociados a la resistencia a las GIN. El recuento de huevos en heces, o FEC (de inglés *Faecal egg count*), es el indicador tradicional usado más comúnmente para valorar el nivel de infección parasitaria en base al número de huevos por gramo de heces. Este carácter también pone de manifiesto el producto de los nematodos adultos establecidos y la fecundidad media de las poblaciones parasitarias residentes (Bishop & Stear, 2000). Otros indicadores del nivel de infección parasitaria son el nivel plasmático de inmunoglobulina A (IgA) y de pepsinógeno (Peps). Estudios previos han identificado QTL en relación a la resistencia ovina a GIN (Crawford et al., 2006; Marshall et al., 2009; Gutiérrez-Gil et al., 2009). Es de señalar el barrido genómico basado en 181 marcadores microsatélites realizado en una población de ganado ovino lechero de raza Churra (Gutiérrez-Gil et al., 2009) en el que se identificó un QTL significativo a nivel de significación genómico en el cromosoma OAR6, y otros cuatro QTL a nivel cromosómico en OAR1, OAR10 y OAR14. En el presente trabajo se presentan los resultados de un análisis de ligamiento para el carácter FEC realizado en otra población ovina de raza Churra genotipada con el SNP-chip ovino de media densidad (*Illumina OvineSNP50 BeadChip*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las medidas fenotípicas para el carácter en estudio se obtuvieron de un total de 596 ovejas adultas de raza Churra repartidas en 21 rebaños, de manejo semiextensivo, distribuidos en 8 de las provincias de Castilla y León. Los animales muestreados están distribuidos en 15 familias de medio-hermanas del núcleo de selección de ANCHE. El tamaño medio por familia fue de 33 hijas por macho. Se realizó un único muestreo por rebaño, en el que se obtuvieron para cada animal muestras de heces y sangre. Las heces se recogieron directamente del recto y fueron procesadas para determinar el número de huevos por gramo de heces utilizando una modificación del método McMaster (MAFF, 1986). Tras la transformación logarítmica de los datos, se obtuvieron los valores fenotípicos, estimados como la desviación de la media poblacional del dato fenotípico bruto de cada animal corregido para el efecto rebaño que, debido al diseño experimental, englobó otros factores ambientales relevantes. Se analizaron 43 784 SNPs que habían pasado el control de calidad de genotipos descrito en un trabajo previo (García-Gómez et al., 2012), donde también se elaboró el mapa genético para la población en estudio con una equivalencia de 1 Mb ~ 1 cM para convertir las distancias físicas en distancias genéticas. Para el análisis de ligamiento realizado en los 26 autosomas ovinos se utilizó el programa *QTLMap* (Filangi et al., 2010). Los umbrales de significación a nivel *chromosome-wise* (p_c -value) se obtuvieron mediante un test de permutaciones y a nivel genómico considerando que se analizaron 26 autosomas independientes (*genome-wise*; p_g -value). Para los QTL significativos identificados se calculó el intervalo de confianza (IC) mediante el método LOD drop-off (Lander & Botstein 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de ligamiento realizado para el carácter estatura a lo largo del genoma autosómico ovino identificó tres QTL a nivel de significación del 5% *chromosome-wise* en OAR4, 6 y 25, y un QTL significativo al nivel 1% *chromosome-wise* en OAR8 (Figura 1). La caracterización de los QTL detectados en el análisis de toda la población (*across-family*) se muestra en la Tabla 1, donde también se puede encontrar información relativa a las familias que mostraron evidencias significativas de segregación de los QTL identificados a nivel poblacional. Para el QTL menos significativo, localizado en OAR25, se identificaron dos familias segregantes, mientras que en los otros tres casos fueron tres las familias que en el análisis intrafamiliar mostraron p_c -values < 0.05. La posición del QTL sugerida por los análisis intrafamiliares discrepó en algunos casos de la posición del pico del QTL en el análisis intrafamiliar, lo que puede deberse a diferencia en la informatividad de los marcadores o, alternativamente, de la presencia de diferentes QTL segregantes entre las diferentes familias.

Figura 1. Resultados del análisis de ligamiento realizado en la población ovina analizada en este estudio para el carácter FEC

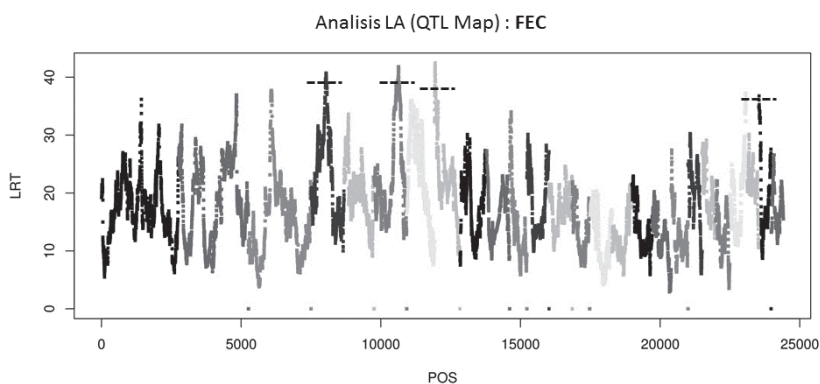


Tabla 1. Caracterización de los QTL identificados a nivel poblacional para el indicador de resistencia a parasitosis gastrointestinales FEC. Se muestran, también los resultados del análisis intrafamiliar para las familias que mostraron evidencia estadística de segregación para alguno de los QTL detectados (p_c -value < 0.05).

OAR	LRT max.	Pos. (cM) LRT max.	Marcadores flanqueantes LRT max.	IC (cM)	Familias segregantes ($p_c < 0.05$)	LRT max.	Pos. (cM) LRT max
4	40.70	54.54	[OAR4_58493210.1 - OAR4_58541568.1]	51.5 - 57.6	fam. 01 fam. 04 fam. 05	11.73 9.70 10.79	54.84 117.94 48.34
6	41.81	87.81	[OAR6_95930760.1 - OAR6_96088929.1]	80.7 - 91.5	fam. 01 fam. 07 fam. 11	10.98 8.73 9.49	95.11 90.21 86.91
8	42.48	2	[OAR8_2125287.1 - OAR8_2209080.1]	1.0 - 3.6	fam. 02 fam. 04 fam. 11	7.77 12.47 9.86	6.40 31.30 1.80
25	36.77	0.88	[OAR25_1031652.1 - s21252.1]	0.1 - 4.1	fam. 05 fam. 16	12.10 13.47	43.28 2.68

El QTL identificado en la parte media de OAR4 se localizó cerca de un QTL previamente descrito para FEC (*Haemonchus contortus*) por Marshall et al. (2009). A este respecto, la coincidencia más destacable fue la identificada en OAR6, ya que el IC aquí estimado para este QTL se solapa con el intervalo flanqueante del QTL más significativo identificado en Churra para la resistencia parasitaria a GIN, y que influía también el recuento de huevos en heces (Gutiérrez-Gil et al., 2009). Los dos QTL identificados en OAR8 y OAR25 se

localizaron en el extremo proximal del correspondiente grupo de ligamiento. Estos cromosomas también contienen QTL previamente descritos en relación a la resistencia a GIN, aunque en ambos casos el máximo estadístico esos QTL se localiza en una región más distal del cromosoma (Marshall et al., 2009; Crawford et al., 2006) que la identificada como candidata en el presente estudio. Con el objetivo de confirmar los resultados aquí presentados e identificar nuevas regiones de interés, pretendemos realizar análisis adicionales basados en el análisis de ligamiento combinado con análisis de desequilibrio de ligamiento (LDLA) o análisis de asociación a nivel genómico (GWAS). Del mismo modo se planea el estudio de otros fenotipos indicadores de resistencia a GIN, como el nivel plasmático de IgA. La identificación del QTL del cromosoma 6, localizado en la misma región y con efectos sobre el mismo carácter que el descrito anteriormente por Gutiérrez-Gil et al. (2009), sugiere la confirmación de dicho efecto e indicaría la conveniencia de centrar esfuerzos en el mapeo fino de dicha región.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bishop S.C. & Stear M.J. 2000. *Parasitology*, 121: 435-440.
- Crawford A.M., Paterson K.A., Dodds K.G., Diez Tascon C., Williamson P.A., Roberts Thomson M., et al. 2006. *BMC Genomics* 18:178.
- Filangi O., Moreno C., Gilbert H., Legarra A., Le Roy P., Elsen J.M. 2010. *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: 1-6 August; Leipzig*.
- García-Gámez E., Sahana G., Gutiérrez-Gil B., Arranz J.J. 2012. *BMC Genet.* 13:43.
- Gutiérrez-Gil B., Pérez J., Alvarez L., Martínez-Valladares M., de la Fuente L.F., Bayón Y., Meana A., San Primitivo F., Rojo-Vázquez F.A., Arranz J.J. 2009. *Genet Sel Evol.* 28:41:46.
- Lander E.S., Botstein D. 1989. *Genetics* 121: 185-99.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). 1986. *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, 3rd edn. London, GB.
- Marshall K., Maddox J.F., Lee S.H., Zhang Y., Kahn L., Graser H.U. et al. 2009. *Anim Genet.* 40: 262-72.
- McKellar Q.A., Duncan J.L., Armour J., & McWilliam P. 1986. *Res Vet Sci* 40, 367-371.
- Smith W.D., Jackson F., Jackson E., & Williams J. 1985. *Journal of Comparative Pathology* 95, 235-245.
- Stear M.J., Bishop S.C., Doligalska M., Duncan J.L., Holmes P.H., Irvine J., McCririe L., McKellar Q.A., Sinski E., Murray M. 1995. *Parasite Immunol.* 17: 643-652.
- Ziegler I.R., König F.P. 2010. *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology: Concepts and Applications*. 2nd Ed. Wiley-Blackwell.

Agradecimientos: Este trabajo está financiado por los proyectos LE245- A12-2 financiado por la Junta de Castilla y León y *NematodeSystemHealth-Initial Training Network* de la Comisión Europea. M.A. Está financiada por el proyecto *NematodeSystemHealth-Initial Training Network*.

A GENOME SCAN WITH THE OVINE 50K SNP-CHIP FOR THE DETECTION OF QTL INFLUENCING RESISTANCE TO GASTROINTESTINAL NEMATODES IN SPANISH CHURRA SHEEP: LINKAGE ANALYSIS FOR FAECAL EGG COUNT.

ABSTRACT: Infections with gastrointestinal nematodes (GIN) remain one of the most prevalent parasitic diseases causing major economic losses in the sheep industries worldwide. In the last years, the increasing prevalence of resistance to anthelmintic has led to the search for alternative control methods such as selective breeding for increased GIN resistance. This study presents a linkage analysis for detection of QTL for faecal egg count (FEC), the traditional indicator trait commonly used to assess the level of GIN by the number of eggs per gram of faeces, in a commercial population of Spanish Churra sheep. The resource population included 596 adult ewes from 21 flocks and 15 half-sib families of the selection nucleus of the Churra sheep breeding programme. Faecal samples were collected from the studied animals for which genotypes for the Illumina OvineSNP50 BeadChip were already available. Chromosome-wise significant QTL were detected on chromosomes 4, 6, 8 and 25. The QTL identified on the first two of these chromosomes showed interesting coincidences with QTL previously reported in sheep for indicators of resistance to GIN. The results reported here suggest that the most significant QTL previously reported for FEC in Churra sheep by a microsatellite-based genome scan, on chromosome 6, is confirmed in the new analysed population.

Keywords: sheep, gastrointestinal nematode infection, resistance, QTL, linkage

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ARQUITECTURA GENÉTICA DEL CARÁCTER “ESTATURA” EN EL GANADO OVINO MEDIANTE UN ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

Suarez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., García-Gámez, E. y Arranz, J.J.
Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071
León. E-mail: asuav@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Desde 2003 el programa de mejora lechera de la raza Churra incluye en el cálculo del índice de selección la valoración para caracteres de morfología mamaria y de conformación corporal. Estos últimos incluyen los caracteres de anchura de la grupa, estatura, aplomos traseros, inclinación de los talones, y un carácter general que valora la apariencia general del animal. Un barrido genómico previo, basado en el análisis de 181 marcadores microsatélites, realizado en una población comercial del núcleo de selección de la asociación de criadores de ganado ovino selecto de raza Churra (ANCHE) identificó un total de siete QTL significativos a nivel cromosómico para caracteres de conformación corporal, dos de ellos, con efectos sobre el carácter “estatura”, localizados en los cromosomas ovinos OAR4 y OAR26 (Gutiérrez-Gil et al., 2011). En la actualidad, el *Illumina Ovine SNP50BeadChip* permite analizar el genoma ovino con un incremento sustancial de la densidad de marcadores ofreciendo un mayor poder de detección de regiones genómicas relacionadas con caracteres de interés productivo. En este estudio preliminar presentamos un análisis de ligamiento basado en esta herramienta genómica con el objetivo de detectar QTL con influencia sobre el carácter estatura medido en una población comercial de ganado ovino de raza Churra. El carácter estatura, o caracteres relacionados con el tamaño corporal, han sido ampliamente estudiados tanto en humanos como en animales (revisado por Kemper et al., 2012). Los estudios de asociación a nivel genómico (GWAS) realizados en humanos ponen de manifiesto que un número elevado de variantes genéticas controlan la arquitectura genética de este carácter complejo; de forma similar en el ganado vacuno se han descrito múltiples QTL que afectan al tamaño corporal de esta especie. En este estudio se presentan los resultados preliminares del análisis realizado con un chip de media densidad en ganado ovino. Pretendemos conocer la arquitectura genética de este carácter en la oveja y compararla con la descrita en otras especies más estudiadas como el ganado bovino, el ratón o la especie humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

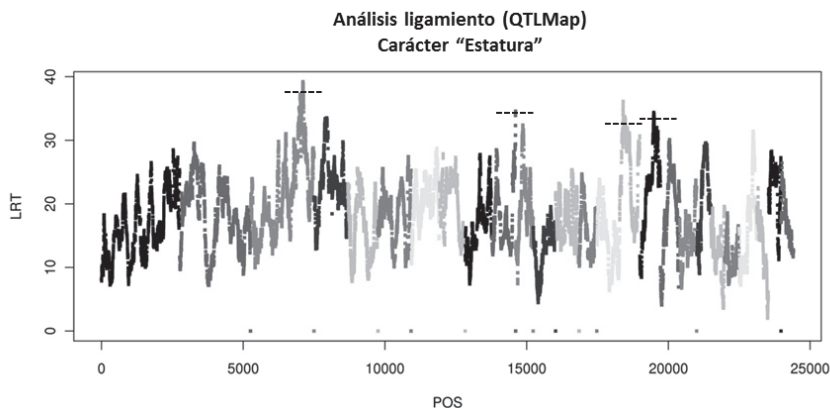
La población objeto de estudio incluyó un total de 1 696 ovejas de raza Churra distribuidas en 16 familias de medio-hermanas del núcleo de selección de ANCHE. El tamaño medio por familia fue de 105 hijas por macho (rango: 29-277). El carácter analizado fue la estatura a la alzada del animal, valorada en base a una escala línea del 0 al 9 (De la Fuente et al., 2003). Como variable dependiente del análisis de QTL se utilizaron las *Yield Deviations* (YDs) estimadas, para el carácter en estudio, como la desviación de la media poblacional del dato fenotípico bruto corregido para los factores fijos que influyen sobre el carácter y el efecto permanente del animal. También se tuvo en cuenta la precisión de la estimación en función del número de medidas repetidas disponibles para cada animal. Toda la población, incluyendo los machos cabeza de pedigrí, fue genotipada con el *Illumina OvineSNP50 BeadChip*. Tras un control de calidad de los genotipos por animal y posteriormente por SNP descrito en detalle por García-Gámez et al. (2012), se realizaron los análisis de detección de QTL para un total de 1 681 animales y 43 784 marcadores. El mapa genético utilizado en este análisis es el descrito también en ese trabajo previo (García-Gámez et al., 2012) con una equivalencia de 1 Mb ~ 1 cM. Para el análisis de ligamiento realizado en los 26 autosomas ovinos se utilizó el programa *QTLMap* (Filangi et al., 2010), que lleva a cabo un mapeo por intervalos basado en máxima verosimilitud. El análisis de detección de QTL se realizó cada 0,1 cM usando la opción de cálculo para un solo carácter. Los umbrales de significación a nivel *chromosome-wise* (p_c -value) se obtuvieron mediante un test de permutaciones a intervalos de 5 cM. En base a estos umbrales, y teniendo en cuenta el número de cromosomas analizados, se obtuvo el umbral de significación del 5% *genome-wise* (p_g -value). Para los QTL significativos identificados se calculó el intervalo de confianza (IC) mediante el método LOD drop-off (Lander & Botstein 1989), convirtiendo los

estadísticos LRT en valores “LOD-score” mediante la fórmula $LOD = LRT/2 \ln(10)$ (Ziegler & König, 2010). Se identificaron las familias segregantes para los QTL identificados (machos de genotipo *Qq* para el QTL) en base a los análisis intrafamiliares realizados y los correspondientes test de permutaciones (p_c -chromosome-wise < 0.05). Ante la ausencia de resultados sobre este carácter en el ganado ovino, para los IC de los QTL detectados se determinó la región ortóloga bovina, buscando la posible correspondencia de esas regiones con QTL identificados en ganado vacuno para estatura, utilizando la base de datos cattleQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>). Con el fin de identificar genes candidatos funcionales incluidos en los IC de los QTL identificados, se utilizó la herramienta *Biomart* (Smedley et al., 2009) para extraer los genes anotados dentro de esas regiones a partir de la versión UMD3.1 del genoma bovino.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de ligamiento realizado para el carácter estatura a lo largo del genoma autosómico ovino identificó cuatro QTL a nivel de significación del 5% *chromosome-wise* en OAR3, 10, 16 y 17 (Figura 1). La caracterización de los QTL detectados en el análisis de toda la población (*across-family*) se muestra en la Tabla 1 donde también se indican los resultados del análisis intrafamiliar para las familias que mostraron evidencias significativas de segregación de los QTL identificados a nivel poblacional.

Figura 1. Resultados del análisis de ligamiento para el carácter estatura realizado en la población comercial de ovejas Churra analizada en este estudio



Para los QTL identificados en OAR3 y OAR16 se identificaron dos familias segregantes mientras que fueron tres las familias que mostraron evidencias de segregación para los QTL identificados en OAR10 y OAR17. En general las posiciones del máximo LRT en los análisis intrafamiliares fueron cercanas a las posiciones del pico del QTL en el análisis *across-family*, aunque en algunas ocasiones el máximo LRT para alguna de las familias significativas se localizó en otra región del cromosoma (ej, fam05 para OAR10, fam03 para OAR16).

La búsqueda de correspondencia con QTL identificados en ganado bovino para el carácter estatura puso de manifiesto una interesante coincidencia para el QTL localizado en OAR3, ortólogo del cromosoma bovino BTA5, donde se han descrito QTL para el carácter estatura, tanto en vacas lecheras (Schrooten et al., 2000) como en la raza cárnica Angus (McClure et al., 2010). En esta misma región de BTA5 también se localizan QTL para el peso de la canal y el peso al nacimiento. En el caso de los QTL detectados en OAR10, OAR16 y OAR17 se han descrito QTL en las regiones ortólogas correspondientes de la vaca en relación al peso corporal de la raza Angus en distintas etapas del crecimiento (McClure et al., 2010).

La lista de genes candidatos posicionales, obtenidos al analizar las regiones ortólogas bovinas de los IC de los QTL detectados, incluye un total de 228 genes para las cuatro regiones identificadas. Al contrastar estos genes con una lista de 82 genes asociados al carácter estatura en mamíferos (Guo et al., 2012, Kemper et al., 2012;

http://www.gghjournal.com/volume24/2/ab01.cfm) no se identificó ninguna coincidencia. Es necesario, sin embargo, realizar un estudio más exhaustivo de las funciones biológicas de los candidatos posicionales identificados y su posible relación con caracteres de crecimiento

Tabla 1. Caracterización de los QTL con influencia sobre el carácter estatura identificados a nivel poblacional (across-family) en este estudio. Se muestran también los resultados del análisis intrafamiliar para las familias que mostraron evidencia estadística de segregación para alguno de los QTL detectados (p_c -value < 0.05).

Análisis across-family					Análisis intrafamiliar		
OAR	LRT max.	Pos. (cM) LRT max.	Marcadores flanqueantes LRT max.	IC (cM)	Familias segreg.	LRT max.	Pos. (cM) LRT max
3	39.21	185.00	[OAR3_199419936 - OAR3_199445550]	180.4 - 187.1	fam. 13	9.21	191.84
					fam. 15	13.14	158.24
10	34.57	83.44	[s75340 - s69331]	83.0 - 83.6	fam. 02	17.00	83.54
					fam. 04	13.15	73.64
					fam. 05	8.18	15.34
					fam. 03	7.82	67.96
16	36.13	12.56	[s72528 - OAR16_13527056]	11.8 - 20.5	fam. 15	8.55	12.56
					fam. 01	6.74	54.45
17	34.40	49.35	[OAR17_53440227 - OAR17_53499592_X]	46.0 - 54.0	fam. 03	6.71	66.95
					fam. 15	6.78	49.75

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De la Fuente L.F., Rodríguez R., Romo E.J. 2003. Feagas, 23: 73-77.
- Filangi O., Moreno C., Gilbert H., Legarra A., Le Roy P., Elsen J.M. 2010. Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: 1-6 August; Leipzig.
- Guo J., Jorjani H., Carlborg O. 2012. BMC Genet.13:82.
- García-Gómez E., Sahana G., Gutiérrez-Gil B., Arranz J.J.2012. BMC Genet.13:43.
- Gutiérrez-Gil B., Alvarez L., de la Fuente L.F., Sanchez J.P., San Primitivo F., Arranz J.J. 2011. J Dairy Sci. 94: 4119-28.
- Kemper K.E., Visscher P.M., Goddard M.E. 2012. Genome Biol. 13: 244.
- Lander E.S., Botstein D. 1989. Genetics 121: 185-99.
- McClure M.C., Morsci N.S., Schnabel R.D., Kim J.W., Yao P., Rolf M.M., McKay S.D., Gregg S.J., Chapple R.H., Northcutt S.L., Taylor J.F. 2010. Anim Genet. 41: 597-607.
- Schrooten C., Bovenhuis H., Coppieters W., Van Arendonk J A. 2000. J Dairy Sc 83: 795-806.
- Smedley D., Haider S., Ballester B., Holland R., London D., Thorisson G., Kasprzyk A. 2009. BioMart--biological queries made easy. BMC Genomics.10:22.
- Ziegler, I.R., König F.P. 2010. A Statistical Approach to Genetic Epidemiology: Concepts and Applications. 2nd Ed. Wiley-Blackwell.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto sheepGEchip (AGL2009-07000) del Ministerio de Ciencia e innovación y el proyecto 3SR de la Comisión Europea. (ASV y EGG son becarias FPU, Ministerio de Educación).

PRELIMINARY STUDY OF THE GENETIC ARCHITECTURE OF STATURE IN SHEEP THROUGH A LINKAGE ANALYSIS.

ABSTRACT: Stature is one of the body conformation traits included in the selection index currently applied in the dairy breeding program of Spanish Churra sheep. This study presents a preliminary linkage analysis based on the *Illumina Ovine SNP50BeadChip* for detection of QTL influencing stature. In humans the genetic architecture of this trait appears to be controlled by a large number of loci, similarly than in cattle, where many QTL affecting different components of bovine stature have been reported. The linkage analysis reported herein identified four QTL significant at the 5% chromosome-wise level on sheep chromosomes 3, 10, 16 and 17. Interestingly, QTL for stature in both dairy and beef cattle breeds have been identified in the bovine orthologous region of the chromosome 3 QTL. Based on a literature review, no obvious functional candidate genes were identified within the confidence intervals of the QTL identified. This study, as a first analysis based on a medium density ovine SNP-chip, provides a first opportunity to compare the genetic architecture of the ovine stature with that described in other species such as humans and cattle.

Keywords: sheep, stature, QTL, linkage

BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES CAUSALES PARA ARTROGRIPOSIS Y MACROGLOSIA EN VACUNO DE RAZA PIEMONTESE: RESULTADOS PRELIMINARES

Biscarini F.¹, Del Corvo M.¹, Stella A.¹, Albera A.², Ferenčaković M.³ y Pollott G.⁴

¹PTP, Departamento de bioinformática, Via Einstein, 26900 Lodi (Italia)

²ANABORAPI, Strada Trinità 32/A, 12061 Carrù (CN), Italia

³Universidad de Zagreb, Svetosimunska 25, 10000 Zagreb (Croacia)

⁴RVC, Departamento de producción y sanidad animal, Royal College Street, NW1 0TU Londres (RU)
filippo.biscarini@tecnoparco.org

INTRODUCCIÓN

Artrogriposis y macroglosia son dos malformaciones congénitas que pueden afectar al ganado vacuno. El término artrogriposis se refiere a la anquilosis de una o más de las articulaciones distales de las patas y a la subsiguiente atrofia degenerativa de los músculos relacionados. La macroglosia es una tumefacción de la lengua que puede dificultar la capacidad de amamantamiento del ternero. Ambas condiciones pueden producir distocia, mortalidad peri-natal y reducido incremento ponderal. Artrogriposis y macroglosia son problemas relevantes en la cría de vacuno de raza Piemontesa debido a la pérdida de terneros de alto valor comercial. Por lo tanto, se han tratado de implementar esquemas empíricos de selección basados en la incidencia de estas malformaciones en la progenie de los toros. Este tipo de selección fenotípica ha resultado ser bastante efectiva: en la población italiana de Piemontesas, la incidencia de artrogriposis ha caído de 4.4% en machos y 0.66% en hembras a principio de los años 1990, a 0.85% en machos y 0.16% en hembras en el 2010. De forma similar, la incidencia de macroglosia se ha reducido de 2.85% y 0.47% en los años noventa a 1.57% y 0.28% en 2010, en machos y hembras respectivamente. Mejoras en la gestión de la granja y en el tratamiento de estas malformaciones pueden haber contribuido a esta reducción de incidencia.

El patrón de transmisión genealógica de la artrogriposis y la macroglosia sugiere la existencia de una base genética en ambas malformaciones. No obstante, es posible que factores ambientales influyan en la manifestación y gravedad de las mismas. El descubrimiento de las mutaciones subyacentes a las dos malformaciones sería de gran interés para entender mejor sus mecanismos hereditarios y su patogénesis.

En el presente trabajo se analizaron animales afectados con artrogriposis y macroglosia (casos) y animales no afectados (controles) en una población italiana de vacuno de raza Piemontesa utilizando genotipados de marcadores SNPs. Se utilizaron dos métodos de análisis para detectar señales de asociación entre dichas malformaciones y regiones genómicas. Primero se llevó a cabo un estudio de asociación pangénómico, y posteriormente se aplicó el método de autocigosis por diferencia ("autozygosity by difference", Pollott, 2012) para buscar secuencias de homocigosis de posición y tamaño diferentes entre casos y controles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos

Se utilizaron 479 bovinos de raza Piemontesa procedentes de granjas ubicadas en la región italiana de Piemonte. Los animales se repartieron en 3 grupos: el primero estuvo integrado por 15 terneros afectados por artrogriposis, el segundo por 15 terneros afectados por macroglosia, y el tercero por 449 toros de la prueba de progenie y que constituyeron el grupo de control. Todos los individuos analizados fueron machos. Los 479 animales se genotiparon con el chip bovino 50k de 54001 SNPs. Se eliminaron 3814 SNPs por presentar datos perdidos en > 5% de los animales o por ser su posición desconocida.

Métodos de análisis

Se realizaron y compararon dos tipos de análisis: un estudio de asociación pangénómico (GWAS) y la autocigosis por diferencia. Para el estudio de asociación, tratándose de datos binarios (caso-control), se utilizó un modelo de regresión logística:

$$\text{logit}(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 x$$

donde p es la probabilidad de estar afectado por la malformación, x es el número de copias del alelo menor a cada locus, β_0 es la intercepta y β_1 el coeficiente de regresión.

El método de la autocigosis por diferencia (Pollott, 2012) se basa en buscar largas secuencias homocigotas en casos y controles, fijándose en las regiones del genoma en que difieren (autocigosis en los casos y no en los controles, o viceversa). La hipótesis es que la región genómica en la que se halla la mutación presentará secuencias de homocigosis de mayor tamaño en los casos que en los controles. Primero se clasifican, en casos y controles por separado, los SNPs en base al tamaño de la secuencia de homocigosis en que se hallan, asignándose un valor de homocigosis. Este proceso se realiza tanto en casos como en controles por separado. Posteriormente se suman los valores de homocigosis por cromosoma y, con estos datos, se ejecuta el siguiente modelo lineal:

$$\text{HomCrom}_{ij} = \text{Crom}_i + \text{Animal}_{j(k)} + (\text{Crom} \times \text{Status})_{ik} + e_{ij}$$

donde HomCrom_{ij} es el valor de homocigosis del cromosoma i en el animal j , Crom_i es el efecto del cromosoma i , $\text{Animal}_{j(k)}$ es el efecto del animal j anidado en el estado k (caso o control) y $\text{Crom} \times \text{Status}$ es la interacción entre cromosoma y estado (caso o control). Una interacción significativa entre cromosoma y estado indica que ese cromosoma puede albergar una mutación potencialmente relacionada con la enfermedad. En estos cromosomas se representan gráficamente los valores de homocigosis por SNP en casos y controles, y la diferencia entre los dos, con el fin de localizar las regiones SNP del genoma asociadas con las malformaciones.

La preparación de los datos y la regresión logística se realizaron con el entorno de programación R. El análisis de autocigosis por diferencia se realizó con los programas desarrollados por Pollott (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron señales claras de asociación entre fenotipo y marcadores para ninguna de las dos malformaciones cuando se ejecutó el modelo de regresión logística en casos y controles. Solo se detectaron asociaciones esporádicas que probablemente fueran espurias (Figura 1).

Posteriormente se analizaron los datos con el método de autocigosis por diferencia. Primero se buscaron los cromosomas que potencialmente albergaran una mutación relacionada con las malformaciones. Se encontraron significativamente más SNPs homocigóticos en casos que en controles en el cromosoma 9 para la macroglosia, y en los cromosomas 1, 4, 10, 14, 15, 17, 18, 21 y 24 para la artrogriposis. En todos los casos se trató de diferencias mucho menores a las observadas en otros estudios en los que se aplicó la autocigosis por diferencia (Pollott 2012). El gráfico de los valores de homocigosis reveló una sola secuencia corta de homocigosis diferente entre casos y controles para artrogriposis en el cromosoma 6 (Figura 2, derecha). En el cromosoma 2 se detectó una secuencia larga de homocigosis común a casos y controles, entre 6116319 y 9553018 bps (Figura 2, izquierda). Esta región contiene el gen de la miostatina, cuya mutación es responsable de los desarrollados músculos (“doble grupa”) característicos de la raza Piemontesa. O’Rourke et al. (2012) y Grobet et al. (1998) sugirieron que se trata de una mutación de la miostatina distinta a la de otras razas con doble grupa (p. ej. la Blanco Azul Belga). Sin embargo, esta homocigosis común a toda la población podría deberse a penetrancia incompleta (animales con el mismo genotipo no expresan siempre el fenotipo correspondiente).

La falta de claras asociaciones entre marcadores y artrogriposis o macroglosia, podría ser consecuencia de sesgo muestral (“ascertainment bias”), de que los polimorfismos asociados a las mutaciones no se encuentran en el chip bovino 50k, o de que las malformaciones

están causadas por otro tipo de variabilidad genética como la variación del número de copias (CNV, sobre-expresión de genes).

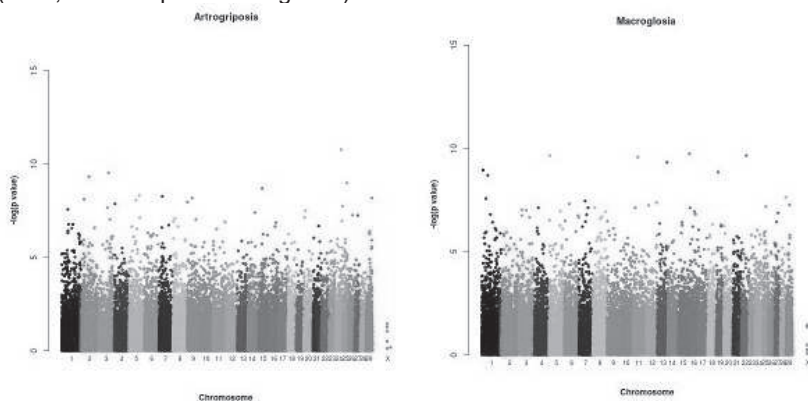


Figura 1: Manhattan plots de los resultados ($-\log(p_value)$) del estudio de asociación entre marcadores y artrogriposis (izquierda) o macroglosia (derecha)

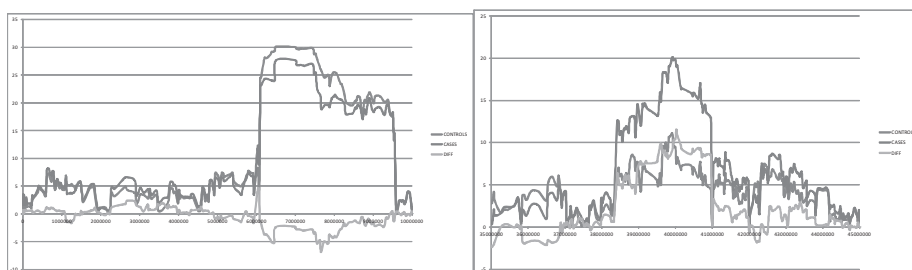


Figura 2: valores de homocigosis para casos (rojo), controles (azul) y diferencia entre los dos (verde) para macroglosia en el cromosoma 2 (izquierda) y para artrogriposis en el cromosoma 6 (derecha)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Pollott, G.E. 2012. 63rd EAAP, Bratislava (Slovakia). • Grobet, L., Poncet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Ménéssier, F., Zanotti, M., Dunner, S. & Georges, M. 1998. *Mamm. Genome* 9(3):210-213. • O'Rourke, B.A., Greenwood, P.L., Authur, P.F. & Goddard, M.E. 2012. *Anim. Genet.*

LOOKING FOR THE MUTATIONS FOR ARTHROGRYPOSIS AND MACROGLOSSIA IN PIEDMONTSE CATTLE: PRELIMINARY RESULTS

A population of Piedmontese cattle was analysed in a study aimed at looking for the causal mutations for arthrogrypsis and macroglossia. These two malformations affect calves and can lead to dystocia, peri-natal mortality and impaired growth. A sample of 15 calves affected by macroglossia and 15 calves affected by arthrogrypsis were available. The control sample was constituted by 449 bulls from the Italian Piedmontese cattle progeny testing scheme. All animals were genotyped with the Illumina 50k bovine SNP chip. Two methods of analysis were used: a genome-wide association study (GWAS) of cases and controls and the analysis of runs of homozygosity (autozygosity-by-difference). No clear signal of association was detected in the GWAS. On chromosome 6, a short sequence for which levels of homozygosity in cases and controls differed was detected for arthrogrypsis. On chromosome 2, a common stretch of homozygosity in cases and controls was detected, in the region harbouring the myostatin mutation, responsible for the characteristic double-muscling of Piedmontese cattle.

Keywords: Piedmontese cattle, arthrogrypsis, macroglossia, autozygosity by difference.

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÓMICO PARA EL CONTENIDO Y LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDOS DUROC

¹Manunza*, A, ¹González*, R., ²Quintanilla, R., ¹Mercadé, A., ¹Castelló, A, ²Hernández, J., ³Pena, R.N., ⁴Casellas, J. y ¹Amills, M.

¹Departament de Genètica Animal, Centre de Recerca en Agrigenòmica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; ²Genètica i Millora Animal, IRTA, Lleida 25198;

³Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida, Lleida 25198; ⁴Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193. (rayner.prendes@gmail.com). *Ambos autores comparten la primera autoría

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los factores genéticos que regulan la variabilidad fenotípica del contenido y la composición de la grasa intramuscular (GIM) puede contribuir a mejorar las propiedades tecnológicas y el valor nutricional de la carne porcina. La implementación de los análisis de asociación a nivel genómico (GWAS) ha permitido progresar en el conocimiento de la arquitectura genética de este tipo de caracteres. En un estudio reciente, Ramayo-Caldas et al. (2012) identificaron 813 SNP, distribuidos en 43 intervalos cromosómicos, asociados con el porcentaje y la composición de GIM. Asimismo, se ha determinado que el gen *ELOVL6* contiene una posible mutación causal, a nivel de promotor, que explicaría la segregación de un QTL SSC8 para los ácidos grasos palmítico y palmitoleico (Corominas et al. 2013). El objetivo del presente trabajo consiste en realizar un GWAS para identificar regiones genómicas asociadas a la variación fenotípica del contenido y la composición de GIM en una población comercial Duroc, en la cual se ha obtenido registros fenotípicos en los músculos *gluteus medius* (GM) y *longissimus dorsi* (LD).

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio de asociación se incluyeron los siguientes fenotipos: contenido de GIM y colesterol (Chol), así como el porcentaje de los ácidos grasos palmítico (C16:00), esteárico (C18:00), oleico (C18:1n9) y linoleico (C18:2n6c). Como material animal, se utilizó una población de 350 cerdos castrados pertenecientes a una línea comercial de la raza Duroc. La información genotípica se obtuvo con el Porcine SNP60 BeadChip (Illumina) mediante el protocolo *Infinium HD Assay Ultra*. Todos los análisis fueron realizados con el software PLINK v1.07 (Purcell et al., 2007). El número de SNP genotipados fue de 62,163 SNPs, sin embargo se eliminaron aquellos SNP cuyo alelo minoritario presentaba una frecuencia alélica inferior al 5%, así como aquéllos con un porcentaje de individuos no-genotipables superior al 5% o cuya segregación no concordaba con la ley de Hardy-Weinberg. Una vez finalizado este proceso de filtrado, el número de individuos y SNP disponibles fue de 320 y 38.800, respectivamente. Los fenotipos de lípidos musculares fueron analizados considerando tres modelos distintos:

$$\begin{aligned} \text{I-} & Y_{ijk}(\text{GIM}) = \mu + L_i + F_{\text{cov}j} + a_{\text{SNP},k} + e_{ijk}. \\ \text{II-} & Y_{ik}(\text{Chol}) = \mu + L_i + a_{\text{SNP},k} + e_{ik}. \\ \text{III-} & Y_{jk}(\% \text{AG}) = \mu + L_j + F_{\text{cov}j} + a_{\text{SNP},k} + e_{jk}. \end{aligned}$$

Dónde: Y_i : Fenotipo, μ : Media general de las observaciones; L_i : Lote del individuo (4 niveles); $F_{j \text{ cov}}$: Espesor del tocino dorsal ($Y_{ijk}=\text{GIM}$); $F_{j \text{ cov}}$: GIM para ($Y_{jk}=\% \text{AG}$); $a_{\text{SNP},k}$: Efecto aditivo del marcador; e_i : Residuo. Los *P-values* nominales fueron corregidos mediante el test de permutación implementado en PLINK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la aproximación GWAS, se detectaron asociaciones significativas para 3 de los 6 fenotipos analizados. Concretamente 24 SNPs (4 no mapeados en Ensembl Sscrofa 10.2) localizados en los cromosomas SSC2, SSC3, SSC4, SSC8, SSC10 y SSC14 presentaron asociaciones significativas con GIM del músculo GM (Figura 1.a). Ningún SNP mostró significación, a nivel genómico, con el porcentaje de Chol en LD y GM. Respecto a la composición de AG, se observó la existencia de asociaciones significativas para los ácidos grasos palmítico y esteárico. En cuanto al palmítico en GM, 13 SNPs localizados en SSC5 (Figura 1.b) presentaron asociaciones significativas, mientras que en el caso del esteárico en GM y LD el número de marcadores con asociaciones fue mucho mayor (218 SNP). Su distribución fue la siguiente: para GM, 135 SNPs localizados en los cromosomas SSC1, SSC2, SSC4, SSC5, SSC12, SSC14, SSC17 y SSC18 (Figura 1.c); y para LD, 83 SNPs distribuidos en SSC3, 4, 6, 7, 13, 14 (Figura 1.d).

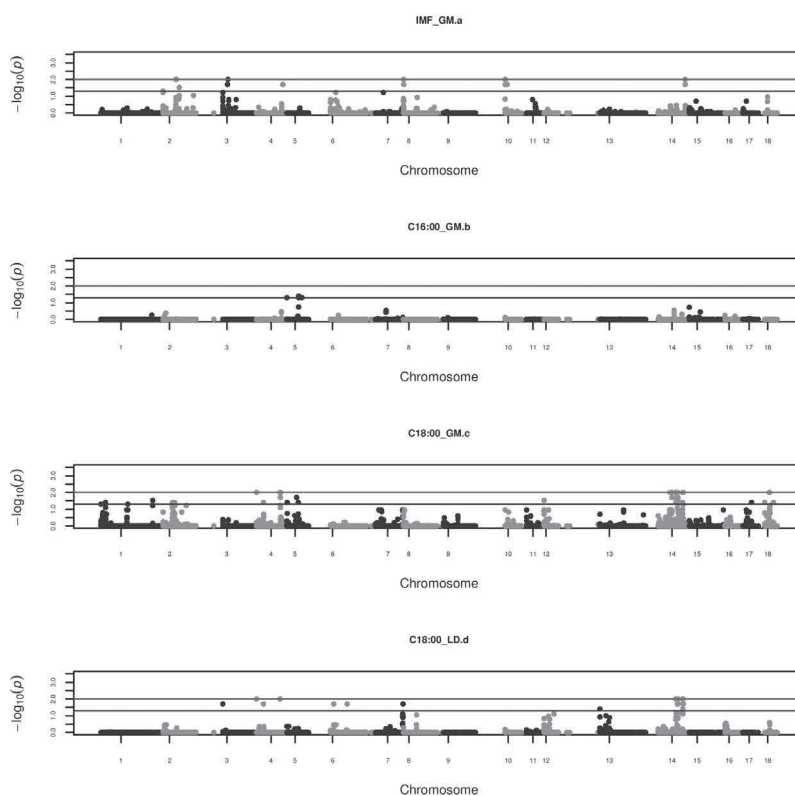


Figura 1. Manhattan plot de las asociaciones genómicas observadas en el análisis GWAS de los siguientes caracteres: a) GIM_GM, b) Palmítico_GM, c) Esteárico_GM, d) Esteárico_LD. Línea roja (p -value=0.01), línea azul (p -value=0.05).

Nuestros resultados fueron parcialmente concordantes con los obtenidos en esta misma población por Hernández-Sánchez et al. (2012). También Ramayo-Caldas et al. (2012) detectaron asociaciones significativas, para los niveles de ácidos grasos del LD, en cromosomas que coinciden con los detectados en este trabajo. El cromosoma con el mayor

número de asociaciones con el porcentaje de esteárico fue SSC14. Una región de SSC14 particularmente relevante es la que abarca los SNPs DIAS0004286, DRGA0014601 y ALGA0081626, puesto que contiene el gen *glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM)* que juega un papel clave en la regulación de los niveles de triglicéridos (Hammond et al. 2002). Por otra parte, Uemoto *et al.* (2012) también detectaron QTL para palmítico, mirístico, oleico y esteárico en SSC14 (150-200 cM), y sugirieron que la mutación causal podría estar localizada en el gen de la esteroil-CoA desaturasa (*SCD1*), un enzima clave en la desaturación de ácidos grasos. Finalmente, se observó una baja concordancia posicional en los análisis GWAS a nivel de los músculos GM y LD, lo cual indica la presencia de algún factor músculo-específico que influye de manera diferencial en el almacenamiento y la composición de la grasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Corominas, J., Ramayo-Caldas, Y., Puig-Oliveras, A., Pérez-Montarelo, D., Noguera, J.L., Folch, J.M., Ballester, M. 2013. PLoS One 8: e53687
- Hammond, L. E., Gallagher, P. A., Wang, S., Hiller, S., Kluckman, K. D., Posey-Marcos, E. L., Maeda, N., Coleman, R. A. 2002. Mol. Cell. Biol. 22: 8204-8214
- Hernández-Sánchez, J., Amills, M., Pena, R. N., Mercadé, A., Manunza, A., Quintanilla, R. 2012. J. Anim. Sci. (en prensa)
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J., Sham, P.C. 2007. Am. J. Hum. Genet. 81: 559-75
- Ramayo-Caldas, Y., Mercadé, A., Castelló, A., Yang, B., Rodríguez, C., Alves, E., Díaz, I., Ibáñez-Escriche, N., Noguera, J.L., Pérez-Enciso, M., Fernández, A.I., Folch, J.M. 2012. J. Anim. Sci. 90: 2883-9
- Uemoto, Y., Soma, Y., Sato, S., Ishida, M., Shibata, T., Kadowaki, H., Kobayashi, E., Suzuki, K. 2012. Anim. Genet. 43: 27-34.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada con los proyectos AGL2010-22208-C02 (Ministerio de Ciencia e Innovación) y CSD 2007-00036 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Programa Consolider Ingenio 2010). Nuestro agradecimiento a *Selección Batallé S.A.* por proporcionar el material animal y por su inestimable colaboración en el protocolo experimental.

A GENOME-WIDE ASSOCIATION ANALYSIS FOR INTRAMUSCULAR FAT CONTENT AND COMPOSITION IN DUROC PIGS

ABSTRACT: Intramuscular fat (IMF), cholesterol (Chol) and fatty acid (FA) contents have important consequences on meat quality as well as on its nutritional properties. In this study we performed a genome-wide association analysis (GWAS) in a Duroc outbred population (N = 350) for IMF, Chol, palmitic, stearic, oleic (C18:1n9) and linoleic (C18:2n6c) percentages in the *gluteus medius* (GM) and *longissimus dorsi* (LD) muscles. Genotypes for 60,000 SNP were obtained with the Illumina Infinium HD Porcine SNP60 Beadchip. Association analyses were carried out with PLINK v1.07, and permutation tests were used to correct for multiple testing. A total of 24 SNPs were significantly associated with GM IMF on chromosomes SSC2, SSC3, SSC4, SSC8, SSC10 and SSC14. With regard to GM FA content phenotypes, associations were observed for palmitic (SSC5) and stearic (SSC1,2,4,5,12,14,17 and 18). Regarding the LD muscle, we found associations with stearic content (SSC3,4,6,7,13 and 14). It is worth to highlight that SSC14 contains most of the associations with muscle lipid traits and that, in general, there is limited concordance between results obtained in the GM and LD GWAS analyses.

Keywords: Genome-wide association analysis, Intramuscular fat, fatty acid, Pigs.

IDENTIFICACIÓN DE UNA ASOCIACIÓN SIGNIFICATIVA ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA ADIPONECTINA (*ADIPOQ*) PORCINA Y LOS NIVELES SÉRICOS DE LDL

¹Quintanilla, R., ²Melo, C., ¹Castelló, A., ²Zidi, A., ³Gallardo, D., ¹Cánovas, A., ³Jordana, J., ⁴Díaz, I., ¹Pena, R.N., ^{2,3}Amills M.

¹Genètica i Millora Animal, IRTA, Lleida 25198; ²Departament de Genètica Animal, Centre de Recerca Agrigenòmica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; ³Departament Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; ⁴IRTA, Centre de Tecnologia de la Carn, Monells 17121. (marcel.amills@uab.cat)

INTRODUCCIÓN

Las concentraciones de lípidos séricos constituyen uno de los principales factores de riesgo en la susceptibilidad a las enfermedades de tipo coronario, considerándose que una ratio baja de lipoproteínas de alta densidad (HDL) vs lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un importante factor predisponente. La elevada similitud fisiológica entre humano y porcino ha impulsado la utilización de esta especie doméstica como modelo biomédico para investigar la arquitectura genética de las concentraciones de lípidos séricos. En este sentido, Gallardo et al. (2008) realizaron un barrido genómico para dichos caracteres en una población comercial Duroc y, entre otros hallazgos, identificaron un QTL para la concentración de LDL a 190 días en el cromosoma 13 (intervalo comprendido entre los marcadores *S0068-SW398*). El análisis del contenido génico de esta región permitió identificar el locus de la adiponectina (*ADIPOQ*) como un posible gen candidato. En humano, se ha demostrado que los niveles de *ADIPOQ* y LDL están correlacionados negativamente (Kantartzis et al. 2006), probablemente debido a que esta adipoproteína aumenta el catabolismo muscular de las lipoproteínas precursoras de las LDL (Qiao et al. 2008).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los niveles de LDL se midieron en cerdos Duroc a la edad de 190 días (N = 350). La metodología empleada así como el manejo productivo de dicha población han sido descritos por Gallardo et al. (2008). La amplificación de 2.37 kb del cDNA *ADIPOQ* se realizó mediante los cebadores indicados en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.5 μM de cada cebador, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) y 2 μl de reacción de retrotranscripción en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico fue distinto para cada uno de los fragmentos analizados: Fragmento 1: 94 °C-1 minuto, 64 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos; Fragmento 2: 94 °C-1 minuto, 61 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos; Fragmentos 3 y 4: 94 °C-1 minuto, 66 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos. Para el genotipado del polimorfismo del gen *ADIPOQ* se utilizó la técnica de pirosecuenciación, empleando un equipo PSQ HS 96 system (Qiagen). Para analizar el efecto del genotipo *ADIPOQ* sobre la concentración de LDL a 190 días, se empleó distintos modelos estadísticos con la finalidad de discriminar entre el efecto del gen *ADIPOQ* y el efecto del QTL para LDL a 190 días. Los modelos empleados en dicho análisis fueron los siguientes:

$y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta cov_{ijkl} + e_{ijkl}$	Modelo 0
$y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta cov_{ijkl} + gen_k + e_{ijkl}$	Modelo G
$y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta cov_{ijkl} + \alpha p_{ijkl} + e_{ijkl}$	Modelo Q
$y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta cov_{ijkl} + gen_k + \alpha p_{ijkl} + e_{ijkl}$	Modelo GQ

Dónde: y_{ijk} son las observaciones fenotípicas (logaritmo de la concentración sérica de LDL a 190 días) del individuo k en los niveles i^h y j^h de los efectos fijos; b_i es el efecto fijo del lote i^h (4 niveles); $d_{j(i)}$ es el efecto fijo de la fecha de extracción de sangre j^h , anidado con el lote de engorde i^h (2 fechas de extracción a 190 días por lote); β y cov_{ijk} son el coeficiente de

regresión y la covariable (espesor del tocino dorsal); gen_k es el efecto del genotipo k^{th} para el gen *ADIPOQ* (tres niveles); p_{ijkl} es la probabilidad de que el individuo l haya heredado cierto alelo vía padre en la posición de máxima significación del QTL (72 cM en SSC13; Gallardo et al. 2008)

Tabla 1. Cebadores utilizados en la caracterización del gen *ADIPOQ* porcino

Fragmento	Nombre	Secuencia del cebador
PCR1	ADIPOQ_Fw1	5'- CTGTTGTTGGGAGCTGTTCT-3'
	ADIPOQ_Rv1	5'- TTGTCAGCATAGACCCCAT-3'
	ADIPOQ_Rvint1 ¹	5'-ATGCCCTGGGATACCCGC-3'
PCR2	ADIPOQ_Fw2	5'- AATGGGGTCTATGCTGACAA-3'
	ADIPOQ_Rv2	5'- TGGGCGTTCACCTTAAGTCTC-3'
	ADIPOQ_Rvint2 ¹	5'-GAAGACCTCAGCCTGGTGG-3'
PCR3	ADIPOQ_Fw3	5'- CAGTCCTGAAGAAGGCACAT-3'
	ADIPOQ_Rv3	5'- TTCTCGGTCATCACAAGGTT-3'
PCR4	ADIPOQ_Fw4	5'- GCAAGCTTTCCTCACACACT-3'
	ADIPOQ_Rv4	5'- TCACTCAAGCTGTTGTCTCCT-3'

¹ Cebadores para la secuenciación de regiones internas del amplicón

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar el alineamiento de las distintas secuencias nucleotídicas del gen *ADIPOQ* porcino se halló un SNP c.*1512G>T localizado en la región 3' UTR. Posteriormente, mediante la técnica de pirosecuenciación se procedió a genotipar dicho polimorfismo en la población experimental Duroc y se realizó un análisis de asociación con cuatro modelos distintos, cuyo resultado puede verse en la Tabla 2.

Tabla 2. Asociación entre el genotipo del locus *ADIPOQ* y la concentración de LDL

Contrastes	Estadístico F (g.l., grados de libertad)	P-valor nominal
Modelo Q vs modelo 0	8.09 (1 g.l.)	0.0059
Modelo G vs modelo 0	7.24 (3 g.l.)	0.0003
Modelo GQ vs modelo Q	3.28 (3 g.l.)	0.0260
Modelo GQ vs modelo G	2.65 (1 g.l.)	0.1081

Cabe destacar que el contraste del modelo que considera el QTL de SSC13 (modelo Q) vs el modelo que incluye el QTL SSC13 y el genotipo del locus *ADIPOQ* (modelo GQ) fue significativo ($P = 0.0260$). Por el contrario, el contraste de los modelos G y GQ no fue significativo. Dicho de otro modo, el efecto significativo del gen *ADIPOQ* sobre la concentración sérica de LDL no desaparece cuando se incluye el QTL SSC13 en el modelo, y en cambio el efecto del QTL sí deja de ser significativo cuando se toma en consideración el genotipo *ADIPOQ*. Todo ello sugiere que existe una asociación genuina entre el genotipo *ADIPOQ* y la concentración sérica de LDL a 190 días, aunque ello no implique necesariamente la existencia de causalidad. Desde un punto de vista fisiológico, este resultado tiene mucho sentido puesto que existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de *ADIPOQ* y la concentración y el tamaño de las partículas LDL (Kantartzis et al. 2006, Lara-Castro et al. 2006). Las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL son los precursores de las LDL y su función consiste en proporcionar triglicéridos a los tejidos. Ha podido demostrarse que la hormona *ADIPOQ* aumenta el catabolismo de las VLDL a nivel muscular incrementando la activación de la lipoproteína lipasa o LPL (Qiao et al. 2008). Más concretamente, Qiao et al. (2008)

produjeron ratones transfectados con un vector adenoviral que expresaban niveles de ADIPOQ doce veces superiores a lo normal, y observaron una disminución del 40% de triglicéridos plasmáticos y ácidos grasos libres, así como un marcado incremento de la actividad y expresión de la LPL muscular y de la expresión de receptores de VLDL. Todo ello implica, necesariamente, una reducción de LDL circulantes.

Con la finalidad de comprender la base molecular de la asociación observada, se está procediendo a determinar si el polimorfismo de la región 3'UTR del locus *ADIPOQ* porcino afecta a los niveles de transcripción de dicho gen

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gallardo, D., Pena, R. N., Amills, M., Varona, L., Ramírez, O., Reixach, J., Díaz, I., Tibau, J., Soler, J., Prat-Cuffi, J. M., Noguera, J. L. & Quintanilla, R. 2008. Mapping of quantitative trait loci for cholesterol, LDL, HDL and triglyceride serum concentrations in pigs. *Physiol Genomics* 35: 199–209.
- Kantartzis, K., Rittig, K., Balletshofer, B., Machann, J., Schick, F., Porubska, K., Fritsche, A., Häring, H.U. & Stefan, N. 2006. The relationships of plasma adiponectin with a favorable lipid profile, decreased inflammation, and less ectopic fat accumulation depend on adiposity. *Clin. Chem.* 52: 1934-42.
- Lara-Castro, C., Luo, N., Wallace, P., Klein, R. L., Garvey, W.T. 2006. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55: 249-259.
- Qiao, L., Zou, C., van der Westhuyzen, D.R. & Shao, J. 2008. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes* 57: 1824-33.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada con los proyectos AGL2010-22208-C02 (Ministerio de Ciencia e Innovación) y CSD 2007-00036 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Programa Consolider Ingenio 2010). Nuestro agradecimiento a *Selección Batallé S.A.* por proporcionar el material animal y por su inestimable colaboración en el protocolo experimental.

IDENTIFICATION OF A SIGNIFICANT ASSOCIATION BETWEEN THE VARIABILITY OF THE PIG ADIPONECTIN (*ADIPOQ*) GENE AND SERUM LDL LEVELS

ABSTRACT: By performing a genome scan for porcine serum lipid traits in a Duroc commercial population, we were able identify a significant QTL for low-density lipoprotein (LDL) concentration at 190 days on chromosome 13 (SSC13). The adiponectin (*ADIPOQ*) locus constitutes a potential candidate gene for this QTL, because the levels of this hormone are strongly correlated with LDL and triglyceride levels. Sequencing of 2.37 Kb of the pig *ADIPOQ* cDNA resulted in the identification of a c.*1512G>T 3'UTR polymorphism. This mutation was genotyped in our Duroc resource population by using a pyrosequencing-based approach. Association analyses with distinct statistical models evidenced that part of the variation of LDL levels is explained by the *ADIPOQ* genotype. This finding matches very well with results obtained in human and model organisms showing that *ADIPOQ* is a major determinant of the catabolism of very-low density lipoproteins, the precursors of LDL, and that variability in the 3'UTR of the human *ADIPOQ* gene is strongly associated with adiponectin levels and body weight.

Keywords: adiponectin, low-density lipoproteins, pig

NUEVO SNP DE LA CALPASTATINA (CAST) ASOCIADO CON LA TERNEZA DE LA CARNE DE BOVINO

L. P. Iguácel¹, J. H. Calvo^{1,2}, J. K. Kirinus³, M. Serrano⁴, G. Ripoll¹, I. Casasús¹, M. Joy¹, L. Pérez-Velasco¹, P. Sarto¹, P. Alberti¹, M. Blanco¹.

¹ CITA Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. lpiguacel@aragon.es ² ARAID ³ Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil ⁴ INIA, Madrid

INTRODUCCIÓN

Los consumidores consideran la terneza como el atributo más importante de la calidad de la carne (Ouali et al., 2006). La tenderización de la carne es muy variable y los consumidores exigen productos homogéneos, por lo tanto, la predicción y certificación de la terneza de la carne es de gran importancia para la industria cárnica.

En la etapa *post-mortem*, la calpaína (CAPN1) es la responsable de la rotura de las proteínas miofibrilares del músculo, mientras que la calpastatina (CAST) inhibe la actividad de la CAPN1. El incremento *post-mortem* de la actividad de CAST ha sido relacionada con una disminución de la terneza de la carne (Koochmaria et al., 1995; Chung y Davis, 2012). En 1995, Koochmaria et al. propusieron la utilización de los polimorfismos de CAST para predecir la terneza de la carne bovina. Diferentes SNPs del gen CAST se han asociado con la terneza en diferentes razas bovinas (Casas et al., 2006, Barendse et al., 2007, Allais et al., 2011).

El objetivo de este estudio fue el aislamiento de SNPs del gen CAST y la caracterización de sus efectos en la terneza de la carne con el fin de proporcionar información que mejore la selección genética de los animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 196 animales, terneros enteros, castrados y hembras de las razas Parda de Montaña (n=144) y Pirenaica (n=52) procedentes de diferentes experimentos realizados en el CITA desde 2003 a 2010. De cada animal se registró dieta (D), género (G), raza (R), peso (PS) y edad al sacrificio. Tras 24 horas a 4°C, se extrajo el músculo *Longissimus thoracis* de la décima costilla de cada canal izquierda. Dicho filete se envasó al vacío y se maduró durante 6 días para determinar la textura instrumental. Los filetes se cocieron en agua (temperatura interna 70°C). Una vez enfriados, se cortaron paralelepípedos con una sección de 10mmx10mm y 30mm de largo que fueron seccionados perpendicularmente con una célula Warner-Bratzler, registrándose el esfuerzo máximo (Kg/cm²). Se estimó el valor animal de la terneza mediante un modelo mixto con la dieta, género, raza, peso y edad al sacrificio como efectos fijos y el animal como efecto aleatorio.

Se extrajo el DNA de las 196 muestras de carne mediante kit comercial. Igualmente, de los animales de los que se disponía el músculo *Longissimus thoracis*, obtenido y conservado en condiciones adecuadas, se extrajo el RNA y se retrotranscribió a cDNA. Se seleccionaron 5 animales de raza Parda de Montaña y 3 de raza Pirenaica con valores extremos de las estimas del efecto del animal sobre la terneza y se amplificó y secuenció el transcrito 2 del gen CAST (GenBank acc. number NM_174003) a partir del cDNA. Con la finalidad de identificar posibles posiciones polimórficas, las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante los programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). La hidropaticidad de la proteína se estudió mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982). De los SNPs encontrados en la secuenciación se realizó el genotipado de las mutaciones que producen un cambio aminoacídico. Dicho genotipado se realizó mediante PCR-RFLPs y sondas TaqMan.

El efecto de los polimorfismos estudiados sobre la terneza de la carne se obtuvo mediante el ajuste a un Modelo Lineal Mixto mediante el procedimiento MIXED del SAS, en el que se incluyen como efectos fijos: genotipo del SNP (S), género anidado a la raza (G(R)) y la interacción entre la dieta y la raza (D x R) y como covariables el peso al sacrificio anidado a la raza (PS(R)). Los efectos aleatorios fueron el animal anidado a la raza (A ~ N(0, σ^2AR)) y el residuo ($e \sim N(0, \sigma^2e)$). La ecuación del modelo fue la siguiente:

$$y = \mu + S + G(R) + D \times R + b(PS(R)) + \text{animal}(R) + e$$

donde y es el esfuerzo (kg/cm²) (terneza), μ es la media de la población, y b es el coeficiente de regresión lineal de y en PS(R), relacionando la variación de la característica como una función del peso al sacrificio en cada raza. Se realizó un segundo análisis incluyendo la

interacción entre el genotipo del SNP y la raza como efecto fijo (S x R). Finalmente, se realizó la comparación directa por pares de las medias mínimo-cuadráticas con la corrección de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la secuenciación del transcrito 2 del gen *CAST*, se encontraron 23 SNPs de los cuales sólo 2, situados en el exón 7, producen un cambio aminoacídico Thr182Ala y Glu193Arg (en relación a la secuencia de referencia depositada en el GenBank NM_174003).

El SNP Thr182Ala fue identificado anteriormente mediante alineamiento de las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank (Motter et al., 2009) pero no fue caracterizado. Los autores concluyeron que no tendría ningún efecto sobre la función de la proteína, lo cual contradice los resultados expuestos en este trabajo.

En el presente estudio, la terneza se asoció con el SNP Thr182Ala ($P = 0,001$) pero no con Glu193Lys ($P = 0,68$) (Tabla 1). En el primer SNP, la carne del genotipo GG resultó ser menos tierna que la de los genotipos AG y AA. Cuando se analizaron los efectos de los SNPs en cada una de las razas por separado, sólo se encontraron efectos en la raza Parda de Montaña pero no en la raza Pirenaica (Tabla 2) debido, probablemente, al bajo número de animales genotipados y a la distribución desigual de los genotipos (AA: 32,7%; AG 53,8%, GG: 13,5%).

El efecto del genotipo del SNP Thr182Ala sobre la terneza fue mayor (0,65 y 0,84 desviaciones estándar para el total de la población y para la Parda de Montaña, respectivamente) que la encontrada por otros autores para otros SNPs en el gen *CAST* (0,20-0,40; Casas et al., 2006, Allais et al., 2011). Además, los genotipos AG y AA tuvieron una terneza similar. Este resultado podría indicar un efecto autosómico recesivo de la mutación Thr182Ala para la terneza de la carne bovina, mientras que otras mutaciones descritas en este gen muestran un efecto autosómico codominante.

El SNP Thr182Ala se localiza en el dominio L de la proteína. La función de este dominio no se conoce bien, pero Melloni et al. (2006) y De Tullio et al. (2009) demostraron que este dominio puede interactuar con el dominio DII de la calpaína, a través de la secuencia de aminoácidos codificada por los exones 4 - 7. Esta interacción es muy específica, pero la estabilidad del complejo de la calpaína-calpastatina depende de las cargas electrostáticas localizadas en las regiones que interactúan. En este sentido, la hidropaticidad asociada a cada aminoácido varía desde -0,7 (Thr) hasta 1,8 (Ala) (escala de Kyte-Doolittle). Además, Thr es uno de los aminoácidos fosforilables, y como observaron De Tullio et al. (2009), la introducción de grupos fosfato negativos afecta negativamente a la estabilidad de esta interacción. Por lo tanto, la sustitución de Thr por Ala podría implicar una unión más estable entre la calpaína y calpastatina. Barendse et al. (2007) encontraron un cambio aminoacídico Pro52Leu en el dominio L asociado con la terneza de la carne, que producía un cambio en la hidropaticidad de la calpastatina. Según dichos autores, el cambio de hidropaticidad en esta región podría afectar a la unión de calpastatina con las membranas celulares y con la calpaína.

En conclusión, el polimorfismo Thr182Ala de *CAST* podría ser responsable de una parte de la varianza en la terneza de la carne en la población estudiada de la raza Parda de Montaña. Es necesario evaluar el efecto de los genotipos de Thr182Ala sobre la actividad de la calpastatina para confirmar los efectos de este nuevo polimorfismo encontrado. El SNP identificado puede ser útil para la industria como un marcador genético para identificar la carne de mayor dureza y adaptar su maduración para garantizar una carne de calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allais, S., Journaux, L., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Raynaud, P., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C. & Renand, G. 2011. *Journal of Animal Science* 89: 1-11.
- Barendse, W., Harrison, B.E., Hawken, R.J., Ferguson, D.M., Thompson, J.M., Thomas, M.B. & Bunch, R.J. 2007. *Genetics* 176 (4): 2601-10.
- Casas, E., White, S.N., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase, C.C., Johnson, D.D. & Smith, T.P.L. 2006. *Journal of Animal Science* 84 (3): 520-5.
- Chung, H. & Davis, M. 2012. *Meat Science* 90: 711-4.
- De Tullio, R., Cantoni, C., Broggio, C., Prato, C., Stifanese, R., Aversa, M., Antolini, R., Pontremoli, S. & Melloni, E. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790 (3): 182-7.
- Dekkers, J.C.M. 2004. *Journal of Animal Science* 82

(Suppl), E313-E328. • Koohmaraie, M., Killefer, J., Bishop, M.D., Schakelford, S.D., Wheeler, T.L. & Arbona, J.R. 1995. In "Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality", European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology pp. 395-410..• Kyte, J. & Doolittle, R. 1982. Journal of Molecular Biology 157: 105-32. • Melloni, E., Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Defranchi, E., Salamino, F. & Pontremoli, S. 2006. Journal of Biological Chemistry 281 (34): 24945-54. • Motter, M.M., Corva, P., Krause, M., Perez Cenci M. & Soria, L. 2009. Journal of Basic and Applied Genetics 20 (1): 15-24. • Ouali, A., Herrera-Mendez, C.H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. & Sentandreu, M.A. 2006 Meat Science 74: 44-58.

Agradecimientos: L. P. Iguácel recibe una beca del Gobierno de Aragón y J. K. Kirinus del Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior. Este estudio fue parcialmente financiado por proyectos de investigación INIA (INIA-RZP-2009-005, RZP-2010-002, RTA-2010-057) y grupos de investigación del Gobierno de Aragón (A11 y A49).

Tabla 1. Efecto fijo de tipo 3 y comparaciones por pares de las medias mínimo-cuadráticas de los polimorfismos en el gen CAST en el esfuerzo del M. Longissimus thoracis tras 7 días de maduración (Kg/cm²).

SNP	F-value	Pr>F	Genotipo		
			AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
Thr182Ala	6,97	0,001	0,05±0,24	-1,35±0,39**	-1,40±0,38**
Glu193Arg	0,38	0,680	0,10±0,96	-0,15±0,93	-0,25±0,28

* P < 0,05; ** P < 0,01.

Tabla 2. Efecto fijo de tipo 3 y comparaciones por pares de las medias mínimo-cuadráticas de raza x genotipo SNP de los polimorfismos en el gen CAST en el esfuerzo del M. Longissimus thoracis tras 7 días de maduración (Kg/cm²).

SNP	F-value	Pr>F	Genotipo		
			AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
Thr182Ala	3,80	0,008			
Parda de Montaña			0,03 ± 0,33	-1,77 ± 0,54*	-1,80 ± 0,55*
Pirenaica			0,11 ± 0,37	-0,90 ± 0,57	-1,01 ± 0,54
Glu193Arg	0,42	0,794			
Parda de Montaña			0,12 ± 1,35	-0,37 ± 1,32	-0,49 ± 0,38
Pirenaica			0,02 ± 1,37	0,08 ± 1,33	0,06 ± 0,44

* P < 0,05;

A NEW SNP IN CALPASTATIN (CAST) GENE ASSOCIATED WITH BEEF TENDERNESS

ABSTRACT: Calpastatin (CAST) inhibits μ - and m-calpain activity and, therefore, regulates *post-mortem* proteolysis, being some SNPs in CAST gen associated to meat tenderness. In this work, a new SNP located at exon 7 (position BTA29: 98535683 on UMD 3.0) was associated to meat tenderness (P= 0.001). Beef from GG genotype was tenderer than that from AG and AA genotypes, which had similar tenderness. This mutation change the amino acid sequence at position Thr182Ala and could change the electrostatic charges localized in the interacting regions between the calpastatin L-domain and calpain. Moreover, heterozygous genotypes did not show either differences with the tender genotype or intermediate tenderness indicating an autosomal recessive inheritance effect of the Thr182Ala mutation for beef tenderness. The effect of the genotype of the Thr182Ala mutation on tenderness was higher (0.65 SD and 0.84 SD for the Total and Parda de Montaña populations, respectively) than those found previously for other SNPs in the CAST gene. Further studies are necessary to test the effect of the CAST Thr182Ala genotypes on calpastatin activity to confirm the effects of this new SNP found in the current experiment.

Keywords: Tenderness, CAST, SNP, beef.

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN PRNP Y LOS CARACTERES LECHEROS EN LA RAZA LATXA

Z.G. Vitezica¹, I. Beltrán de Heredia²; E. Ugarte²

¹INRA, INPT, UMR 1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, Francia

²NEIKER Tecnalia, Campus Agroalimentario de Arkaute, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz, España.

E-mail: zulma.vitezica@ensat.fr

INTRODUCCIÓN

La susceptibilidad al Scrapie es controlada por los polimorfismos en el gen PRNP (Hunter, 1997) y está relacionada con varias mutaciones existentes en los codones 136 (A, V), 154 (R, H), y 171 (R, Q, H). El haplotipo ARR está asociado con la resistencia a la enfermedad, mientras que el VRQ está asociado con la susceptibilidad (Hunter, 1997; Elsen et al, 1999; Díaz et al, 2005).

Un estudio realizado en la raza Latxa por Hurtado et al. (2002) mostró una baja frecuencia, menor del 7%, para el haplotipo resistente ARR. La baja frecuencia de ARR junto con que además hubo solo algunos casos de la enfermedad, llevaron a que el programa de selección obligatorio para la resistencia al Scrapie se planteara en la eliminación del haplotipo VRQ. Estudios preliminares (Legarra et al., 2004) realizados sobre 3.000 animales genotipados no indicaron evidencias de asociación entre los genotipos PRNP y los caracteres de la leche. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras razas ovinas (Barillet et al., 2002; Alvarez et al., 2006; Vitezica et al., 2006; Psifidi et al. 2011).

En la actualidad el número de animales genotipados es mucho mayor por lo que el objetivo de este trabajo fue confirmar la no asociación entre el gen PRNP y los caracteres productivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos proceden del programa de control lechero de la raza Latxa recogidos entre 1985 y 2009 en sus tres ecotipos (Cara Negra del País Vasco: LCNPV; Cara Negra de Navarra: LCNNA y Cara Rubia: LCR). El número de datos y animales para producción de leche fue de 82908 y 27443 en LCNPV; 49793 y 14681 en LCNNA y 109864 y 36000 en LCR. Los valores correspondientes para los caracteres de composición fueron 28975 y 12526; 8568 y 5284 y; 119415 y 9617 para LCNPV, LCNNA y LCR respectivamente.

La Tabla 1 muestra la distribución de genotipos más frecuentes para el gen PRNP. Para el análisis de los diferentes caracteres se aplicaron los modelos utilizados en las evaluaciones genéticas (Legarra et al, 2005; Legarra y Ugarte, 2001). El efecto del gen PRNP fue considerado como un efecto aleatorio. La estimación de los componentes de varianza, incluido el asociado al PRNP, se obtuvieron utilizando los programas de

la familia BLUPF90 (Misztal et al., 2002). Para cada carácter, los resultados de este modelo se compararon con los obtenidos con un modelo simplificado que excluía el efecto del PRNP a través del cociente de verosimilitudes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estimaciones de heredabilidad para producción y calidad de leche se presentan en la Tabla 2. Las estimaciones obtenidas fueron menores que las obtenidas en la raza Lacaune (Barillet et al., 2002) y en la raza Sarda (Sanna et al., 1997) aunque son consistentes con otras estimaciones: Serrano et al. (1996) en la raza Manchega, Othmane et al. (2002) en la raza Churra, y los obtenidos previamente por Legarra y Ugarte (2001) en la raza LCNPV. El efecto del locus de PRNP se evaluó cuantificando la contribución del locus PRNP a la variación genética aditiva (Tabla 2) y analizando el cociente de verosimilitud de modelos que contemplan o (no) el efecto del gen PRNP.

En cuanto a la producción de leche, el modelo con PRNP tuvo un mejor ajuste ($p < 0.05$) en la LCNPV y en LCR. Sin embargo la varianza debida al PRNP fue igual al 0.5% de la varianza aditiva total (PRNP + poligénica). Para los caracteres cualitativos, la inclusión del PRNP mejoró el ajuste ($p < 0.05$) para Kg. de grasa en LCNNA y Kg de proteína en LCR aunque hay que mencionar que las estimaciones de su contribución a la varianza estaban cercanas a cero. De hecho, la contribución del locus PRNP a la varianza aditiva total supone entre un 1,5% y 0,4%. Los resultados sugieren que la contribución del gen PRNP a la variación genética aditiva es prácticamente nula en caracteres de la leche.

Los resultados son consistentes con los obtenidos en las razas que han aplicado una fuerte selección para incrementar la frecuencia ARR. La obtención de los mismos resultados con una estrategia de selección totalmente diferente (eliminación de VRQ) confirmaría la no asociación entre los genotipos PRNP y los caracteres de la leche.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez, L., B. et al. 2006.. *J. Dairy Sci.* 89:1784-1791; Barillet F., et al.. 2002. *Proc. 7th WCGALP*, 31:683-686; Díaz C et al.. 2005.. *J. Gen. Virol.* 86:849-857; Elsen J et al. 1999. *Arch.Virol.* 144:431-445.; Hurtado, A. et al.. 2002.. *Small Rum Res.* 45 : 255-259; Hunter N., 1997. Pages 225-240 in *The genetic of sheep*. Eds. L. Piper, A. Ruvinsky, CAB International, Wallingford.; Legarra, A., and E. Ugarte. 2001. *Anim. Sci.* 73: 407-412.; Legarra, A. et al. 2004. *ITEA 100^a*: 127-133; Legarra, A. et al.. 2005. *Liv. Prod. Sci.* 93: 205-212.; Misztal, I. et al 2002. *Proc. 7th WCGALP. Com. N° 28-07.*; Othmane, M.H. et al. 2002 *J. Dairy Sci.* 85:2692-2698.; Psifidi, A. et al. 2011. *Anim. Genet.* 42:406-414.; Sanna S. R. et al., 1997. *Small Rum. Res.* 25:77–82; Serrano M. et al. 1996. *Small Rum. Res.* 23: 51-57; Vitezica, Z. G. et al. , 2006. *J Anim. Sci.* 84:317-1322.

Agradecimientos: A Andrés Legarra por su ayuda en la comprensión de los ficheros de datos de la raza Latxa.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas de hembras para los tres ecotipos de Latxa.

Genotipo	Latxa Cara Negra del País Vasco (n = 27,443)	Latxa Cara Negra de Navarra (n = 14,681)	Latxa Cara Rubia (n = 36,000)
ARQ/ARH	3.09	6.06	11.41
ARQ/ARQ	49.29	47.47	38.68
ARR/ARQ	34.77	36.37	31.95
ARR/ARR	5.91	6.86	7.27

Tabla 2. Heredabilidades para los caracteres analizados en los tres ecotipos.

Caracter	Latxa Cara Negra del País Vasco		Latxa Cara Negra de Navarra		Latxa Cara Rubia	
	PRNP	Aditivo poligénico	PRNP	Aditivo poligénico	PRNP	Aditivo poligénico
Leche	$1.0 \cdot 10^{-3}$	0.18	$1.4 \cdot 10^{-5}$	0.26	$1.0 \cdot 10^{-3}$	0.22
Kg. grasa	$7.0 \cdot 10^{-5}$	0.13	$3.6 \cdot 10^{-3}$	0.24	$7.7 \cdot 10^{-4}$	0.20
Kg. proteína	$1.9 \cdot 10^{-4}$	0.15	$2.9 \cdot 10^{-3}$	0.27	$9.4 \cdot 10^{-4}$	0.23
% grasa	$3.1 \cdot 10^{-4}$	0.15	$4.0 \cdot 10^{-4}$	0.17	$1.8 \cdot 10^{-4}$	0.23
% proteína	$3.5 \cdot 10^{-4}$	0.39	$8.4 \cdot 10^{-4}$	0.33	$7.9 \cdot 10^{-6}$	0.46

ANALYSIS OF ASSOCIATION BETWEEN PRNP LOCUS AND MILK TRAITS IN LATXA DAIRY SHEEP

ABSTRACT

The purpose of this study was to analyze associations between PRNP gene and ewe milk traits in Latxa breed. To evaluate evidence of association, the different traits were analyzed using an animal model, where the PRNP effect was included or not as a random effect. Adding the PRNP effect to the model improved the fitting ($P < 0.05$) for milk yield in Black-Faced Latxa from Spanish Basque Country and in Blond-Faced Latxa, for fat yield in Black-Faced Latxa from Navarra and for protein yield in Blond-Faced Latxa. However, the part of the phenotypic variance explained by the PRNP effect for milk yield ($1.0 \cdot 10^{-3}$), fat yield ($3.6 \cdot 10^{-3}$) and protein yield ($9.4 \cdot 10^{-4}$) were near zero. The PRNP locus accounts for about 0.5%, 1.5% and 0.4% of total genetic (PRNP+polygenic) variance in milk yield, fat and protein yield. These values indicated that PRNP effect is not relevant in genetic additive contribution. For breeding purposes, it is unlikely that selection for scrapie resistance will have an effect on the milk traits studied in the Latxa breed.

Key words: association analyses, milk trait, PRNP gene, sheep

LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA A EN EL PIENSO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN METABÓLICA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN PORCINO

Ayuso¹, M., Fernández², A., Isabel¹, B., Rey¹, A.I., Benítez², R., Daza³, A., López-Bote¹, C.J., Óvilo², C.

¹ Dpto. Producción Animal, UCM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid

² Dpto. de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra. Coruña Km. 7.5. 28040 Madrid

³ Dpto. Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid

mayher@live.com

INTRODUCCIÓN

La vitamina A (vit A) es un retinoide natural cuya implicación en la regulación transcripcional de numerosos genes ha sido ampliamente estudiada y demostrada (Balmer y Blomhoff, 2002). Hay muchos trabajos realizados en humano y ratón en los que se valora su influencia en procesos fisiológicos muy importantes desde el punto de vista biomédico. También se ha estudiado el efecto de la vit A en especies ganaderas como ovino, vacuno o porcino (Daniel et al., 2004, Siebert et al., 2006, Olivares et al., 2011). Esto es debido a su influencia sobre la adipogénesis, fenómeno muy importante en el ámbito de la producción animal, ya que su alteración puede afectar a la calidad de la canal y de la carne. De hecho, la restricción de vit A en la dieta se ha propuesto como una posible herramienta para mejorar la calidad de la carne.

El objetivo de este estudio es comprobar el efecto de la restricción de vit A en la dieta de cerdos ibéricos sobre la expresión de un panel de genes candidato relacionados con la función de la vit A en relación a la adipogénesis, en tejidos adiposo y hepático. Los genes se han elegido por su importancia en procesos relacionados con el metabolismo y función de la vit A, tales como su activación y almacenamiento (*ADH1C*, *ALDH1A1* y *LRAT*), su transporte y señalización (*RBP4*, *CRABP1* y *FABP5*), así como en el control transcripcional de la adipogénesis (*PPAR γ* , *SREBP1C*, *RAR α* y *RXR γ*) y el control de la lipogénesis y el metabolismo lipídico (*FASN*, *ELOVL6*, *ME1*, *ACACA*, *ACSL4*, *SCD*, *ACOX1*, *INSR*, *IGF1* y *LEP*)

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y toma de muestras: Se emplearon 40 machos castrados ibéricos, de estirpe Torbiscal, nacidos en el CIA "Dehesón del Encinar". A los 2 meses de edad, se establecieron dos grupos experimentales, control (C, n=20) y restringidos (R, n=20), que consumieron el mismo pienso que el grupo control, pero sin aporte de vit A en el corrector. Los animales se pesaron quincenalmente y recibieron el tratamiento hasta su sacrificio. Veinte animales (10C y 10R) se sacrificaron con 100 kg de peso vivo y los otros 20 con 160 kg de peso. Tras el sacrificio, se recogieron muestras de hígado, músculo *longissimus dorsi* y tocino dorsal, a nivel de la última costilla, para el análisis de ácidos grasos (AG) (-20°C) y para el estudio de expresión (-80°C). Se registró el peso de la canal, el espesor del tocino dorsal y el peso de piezas nobles.

Estudio de expresión génica: Se extrajo ARN total con el sistema Ribopure (Ambion) en muestras de grasa dorsal (capa interna) y de hígado. Se diseñaron parejas de cebadores a partir de las secuencias disponibles de ARNm porcino. La cuantificación se llevó a cabo mediante qPCR con SYBR Green (Roche) en un equipo Lightcycler 480 (Roche). Se utilizaron los genes *GAPDH* y *TBP* como endógenos para la normalización.

Análisis estadístico: El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante un modelo lineal mixto en el que se incluye dieta x gen como efecto fijo y como aleatorios los efectos de la camada y el animal, específicos para cada gen (diana y referencia); y el efecto muestra, común a todos los genes (Steibel et al., 2009). Los efectos de la dieta sobre los genes fueron estimados mediante los correspondientes contrastes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento aplicado no produjo ningún efecto significativo sobre el crecimiento o engrasamiento de los animales. Sin embargo, la restricción de vit A afectó al perfil de

AG de la grasa dorsal e intramuscular, incrementando la proporción de AG monoinsaturados.

La expresión de los 20 genes candidato seleccionados pudo cuantificarse eficazmente en ambos tejidos, excepto *LEP* en hígado y *LRAT* en grasa, que no pudieron ser analizados por su escasa expresión.

En la grasa dorsal, los genes *SCD* y *CRABP II* presentaron mayor expresión en el grupo R ($p < 0,05$). La enzima SCD (*stearoyl-CoA desaturase* o Δ -9 *desaturasa*) está relacionada con la desaturación de AG, y su expresión diferencial explica las diferencias fenotípicas encontradas en estos animales en cuanto al grado de saturación de la grasa dorsal e intramuscular, comentadas en otra comunicación. El CRABP II (*cellular retinoic acid binding protein 2*), es una proteína coactivadora del ácido retinoico (AR), que favorece el transporte del AR al núcleo y su unión al receptor nuclear RAR α (retinoic acid receptor alpha) favoreciendo sus efectos transcripcionales de inhibición de la diferenciación de células grasas. Esta proteína se expresa en preadipocitos, pero no en adipocitos maduros (Berry et al., 2010). Por otro lado, la mayor expresión de *CRABP II* en el grupo R podría ser un mecanismo encaminado a favorecer la correcta señalización del escaso AR disponible en este grupo (Budhu y Noy, 2002).

Por el contrario, el gen *RXR γ* presenta menor expresión en el grupo R ($p < 0,0005$), y el gen *INSR* muestra una tendencia similar ($p = 0,053$). El gen *RXR γ* (*retinoid X receptor, gamma*) codifica para un receptor nuclear que interviene en el mecanismo de acción de AR, favoreciendo su efecto antiadipogénico (Bonet et al., 2003). Esto se refleja en los resultados fenotípicos en los que, a pesar de no existir diferencias en cuanto al espesor de tocino dorsal entre tratamientos, si se observa una correlación negativa (-0.683) entre dicho parámetro y la expresión de *RXR γ* ($p < 0,001$). El gen *INSR* (*insulin receptor*) codifica para el receptor que media la acción de la insulina, muy relacionada con el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Al contrario de lo que ocurría con el gen *CRABP II*, la expresión del *INSR* en preadipocitos es muy escasa y aumenta según las células van completando su proceso de diferenciación a adipocitos (Hausman et al., 2009). Los resultados obtenidos para estos dos genes son por tanto concordantes y sugieren una mayor proporción de adipocitos maduros en el grupo C y mayor proporción de preadipocitos en el grupo R, lo que se puede asociar a una adipogénesis más activa, con una continua diferenciación de células madre a preadipocitos (Hausman et al., 2009).

En cuanto al análisis de expresión realizado en el hígado, observamos un efecto positivo de la restricción de vit A sobre la expresión de los genes *IGF1* y *ACSL4* ($p < 0,05$), así como un valor próximo a la significación en el caso de *ACOX1* ($p = 0,059$). *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*) codifica una proteína similar a la insulina en estructura y función, con un papel importante en la estimulación de la proliferación y diferenciación de preadipocitos (Hausman et al., 2009), de modo que su mayor expresión en el grupo R podría favorecer la adipogénesis y el engrasamiento. Las enzimas ACSL4 (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) y ACOX1 (*acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl*) catalizan distintas reacciones de síntesis lipídica y/o β -oxidación de AG, por lo que su mayor expresión en el grupo R indicaría un metabolismo de AG más activo.

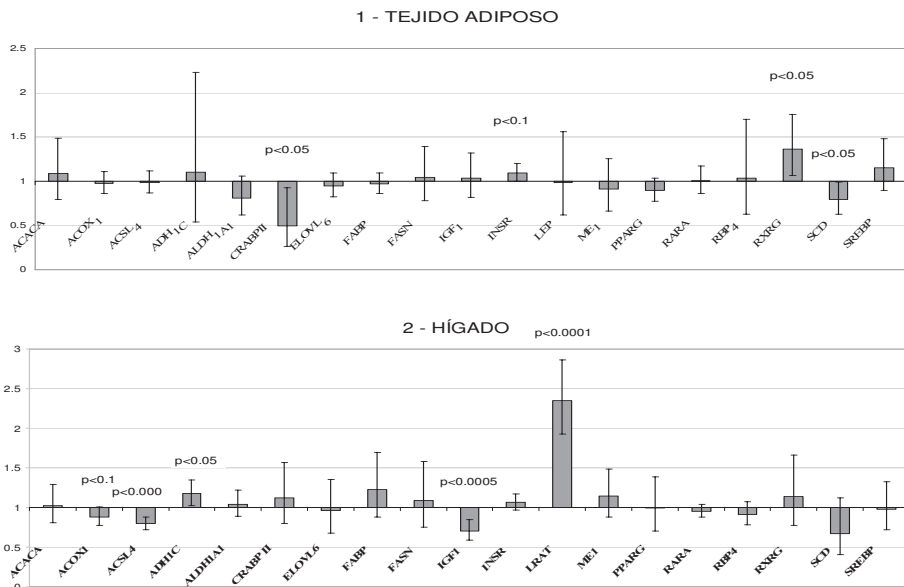
En el caso de los genes *LRAT* y *ADH1C*, que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo del retinol, el efecto de la restricción sobre su expresión en hígado fue negativo ($p < 0,05$). *LRAT* (lecithin retinol acyltransferase) cataliza la esterificación de AR a retinil éster, la forma en la que se almacena. En cuanto a *ADH1C* (*alcohol dehydrogenase 1C*), es la enzima responsable de la oxidación del retinol a retinaldehído para su activación. La menor expresión de ambas enzimas en el grupo R es coherente con la falta de sustrato.

Los resultados obtenidos muestran efectos relativamente modestos de la restricción de vit A sobre la expresión génica, pero concordantes con una adaptación de ambos tejidos a la falta de retinol y con la hipótesis de estimulación de la adipogénesis y el metabolismo lipídico en animales sometidos a dicha restricción

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balmer, J. E. y R. Blomhoff. 2002. *J Lipid Res* 43: 1773-1808. ♦ Berry, D.C., Soltanian, H. & Noy, N. 2010. *J Biol Chem*. 285: 15324-15332. ♦ Bonet, ML., Ribot, J., Felipe, F., Palou, A. 2003. *Cell Mol Life Sci*. 60: 1311-1321. ♦ Budhu, A.S., & Noy, N. 2002. *Mol. Cell. Biol*. 22: 2632-2641. ♦ Daniel, Z.C.T.R., Salter, A.M., Buttery, P. J. 2004. *Anim Sci*. 78: 237-243. ♦ Hausman, GJ, Dodson, MV, Ajuwon, K, Azain, M, Barnes, K, Guan, LL, Jiang, Z, Poulos, S.P., Sainz, R.D., Smith, S., Spurlock, M., Novakofski, J., Fernyhough, M.E. & Bergen, W.G. 2009. *J Anim Sci*. 87: 1218-1246. ♦ Olivares, A., Rey, A.I., Daza, A., López-Bote, C.J. 2011. *Livest Sci*. 137: 31-36. ♦ Siebert, BD., Kruk, ZA., Davis, J., Pitchford, WS., Harper, GS., Bottema, CDK. 2006. *Lipids*. 41: 365-370. ♦ Steibel, JP., Poletto, R., Coussens, PM., Rosa, GJM. 2009. *Genomics*. 94: 146-152.

Agradecimientos: AGL2010-21991-C03-00, CAM-S2009-AGR1704, personal del CIA 'Dehesón del Encinar' (Oropesa, Toledo) e I. Martín de la Torre



Figuras 1 y 2: Cambio de expresión (fold change) de los genes estudiados en grasa (1) e hígado (2) del grupo control frente al restringido. Valores superiores a 1 indican mayor expresión del gen en el grupo C.

DIETARY VITAMIN A MODIFIES THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN METABOLIC REGULATION AND CELL DIFFERENTIATION IN PIGS.

ABSTRACT: Vitamin A (vit A) is a key regulator of gene expression, influencing adipogenesis and lipogenesis in animal tissues. We studied the effect of dietary vit A restriction on the expression of candidate genes for adipogenesis, lipogenesis and vit A metabolism in porcine tissues. Forty Torbiscal pigs were given a standard or a vit A restricted diet from two months of age until sacrifice at 100 and 160kg LW. Vitamin A restriction modified the expression of three genes in adipose tissue (*SCD* and *CRABP1* were upregulated and *RXRg* was downregulated). In liver, *IGF1* and *ACSL4* were upregulated and *LRAT* and *ACOX1* were downregulated. The results show coherent effects of the diet on retinol metabolism and agree with the potential relationship of vit A restriction with adipogenesis and lipid metabolism.

Keywords: Vitamin A, gene expression, adipogenesis, pig.

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA E EN LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS Y EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN *L. THORACIS* DE CORDEROS LIGEROS

L. González-Calvo¹, G. Ripoll¹, F. Molino¹, L. Pérez-Velasco¹, P. Sarto¹, M. Serrano³, M. Joy¹, J. H. Calvo^{1,2}

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930, 50059, Zaragoza. lgonzalezc@aragon.es. ²ARAID. ³INIA, Madrid

INTRODUCCIÓN

La adición de vitamina E en los concentrados es un método efectivo para reducir la oxidación de los productos cárnicos y aumentar su vida útil (Ripoll et al., 2013). La vitamina E es un antioxidante lipo-soluble ampliamente usado en las dietas de los animales, siendo el α -tocoferol su forma más activa (Daley et al., 2010). Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPI n-3), entre ellos el ácido docosapentanoico [DPA,22:5(n-3)], eicosapentanoico [EPA, 20:5(n-3)] y el docosahexanoico [DHA, 22:6(n-3)] además de ser considerados como saludables, están implicados en una gran variedad de funciones celulares, incluyendo regulación génica, fluidez de membrana y como precursores de varias clases de moléculas señalizadoras (Jump, 2002). Sin embargo, debido a su alto grado de insaturación en la cadena alifática, los AGPI n-3 son particularmente sensibles a la peroxidación. El α -tocoferol previene esta peroxidación, eliminando específicamente los radicales peroxilo, previniendo la degradación de lípidos (Traber et al., 2007). Otra vía más económica para incrementar el contenido de α -tocoferol en carne es el pastoreo, debido a la presencia de dicho compuesto en el forraje verde.

En numerosos estudios se ha observado que la vitamina E modula la actividad de muchas enzimas envueltas en la transducción de la señal con una consecuente alteración del comportamiento celular, como puede ser la expresión génica (Nakamura et al., 2009).

Por lo tanto, en el presente estudio, examinamos el efecto de la suplementación con α -tocoferol o pastoreo con alfalfa sobre el contenido de AGPI y la expresión génica de genes clave que intervienen en el metabolismo de AGPI, relacionados con la desaturación de ácidos grasos [*estearoil CoA desaturasa (SCD)*, *Δ 5 desaturasa (FADS1)* y *Δ 6 desaturasa (FADS2)*] y la elongación de ácidos grasos de cadena muy larga [*elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 5 (ELOVL5)* y *elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6 (ELOVL6)*] en músculo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio, 62 corderos machos de raza Rasa Aragonesa provenientes de parto simple fueron distribuidos de forma aleatoria en 5 tratamientos:

- 8 corderos con sus madres estuvieron pastando continuamente en una pradera de alfalfa (A), disponiendo los corderos de concentrado comercial.
- 12 corderos fueron alimentados desde el destete al sacrificio con pienso concentrado comercial (Control, C), sin adicionar α -tocoferol.
- El resto de los corderos fueron alimentados durante diferentes periodos previos al sacrificio con pienso enriquecido con acetato de α -tocoferol (500 mg de DL-acetato de α -tocoferol/kg de concentrado), agrupándose en 3 tratamientos: corderos alimentados con pienso enriquecido con acetato de α -tocoferol entre 4 y 10 días antes del sacrificio (VE10d) (n=11), entre 15 y 25 días (VE20d) (n=20) y entre 30 y 43 días (VE30d) (n=12). El periodo entre el destete y el uso de pienso enriquecido fueron alimentados con el pienso control.

Los animales se sacrificaron cuando alcanzaron el peso "Ternasco" (22-24 kg), y una porción de *L. thoracis* fue extraída y congelada inmediatamente en nitrógeno líquido. El análisis de α -tocoferol en el *L. thoracis* se realizó según el método utilizado por Lyan et al. (2001). Mediante cromatografía de gases, se determinó el perfil de ácidos grasos en grasa intramuscular de las muestras de *L. thoracis*. La extracción del ARN se realizó usando TRI@REAGENT (Sigma Life Science). El ADNc fue obtenido utilizando el kit SuperScript@III Reverse Transcriptase (Invitrogen). El análisis de expresión fue realizado mediante PCR cuantitativa a tiempo real (SYBR green). En el presente trabajo para normalizar los resultados de expresión de los genes de interés hemos testado la estabilidad de 3 genes de expresión constitutiva (*B2M*, *RPL19* y *YWHAZ*) junto con los genes de interés (*SCD*,

FADS1, *FADS2*, *ELOVL5* y *ELOVL6*) utilizando el procedimiento MIXED del SAS (Serrano et al., 2011). Finalmente los datos normalizados se transformaron en n-veces (en inglés fold-change) relativo al grupo control.

La influencia de la inclusión de vitamina E en la dieta sobre la expresión relativa de los genes de interés se estudió con el programa SAS 9.1 empleando el procedimiento MIXED según la metodología descrita por Steibel et al. 2009, en el que se incluyeron como efecto fijo el tratamiento y como covariable el peso al sacrificio. Los efectos aleatorios fueron el animal y el residuo. Se estableció un segundo modelo en el que los días de ingestión de pienso con vitamina E fue incluido como covariable en vez del tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del tiempo de suplementación con α -tocoferol en el músculo *L.thoracis* fue significativo ($P < 0.001$). A partir de 7 días el contenido de α -tocoferol (0.60 $\mu\text{g}/\text{gr}$ carne fresca) comenzó a aumentar respecto al grupo Control (0.17 $\mu\text{g}/\text{gr}$ carne fresca) siendo significativo a 14 días de ingestión (1.11 $\mu\text{g}/\text{gr}$ carne fresca; $P < 0.001$). El grupo alfalfa mostró valores de α -tocoferol cercanos a los alcanzados por el grupo VE10d (0.57 $\mu\text{g}/\text{gr}$ carne fresca). El contenido de EPA, DPA y DHA, que son productos de síntesis de las enzimas *FADS1*, *ELOVL5* y *FADS2*, aumentó significativamente en los corderos en pastoreo ($P < 0.001$) con respecto a los tratamientos con concentrado. Estos resultados son consistentes con lo encontrado por otros autores, en los que los animales alimentados con pasto fresco tienen un alto contenido de AGPI tanto en la leche como en la carne (Woods & Fearon, 2009). Respecto a los animales alimentados con vitamina E durante diferentes días, se observó que el contenido de EPA fue mayor en el grupo VE30d, aunque solo se observó una tendencia (VE30d vs VE10d; $P = 0.06$). El mismo efecto se observó para DPA y DHA, aunque no se encontraron diferencias significativas. Esta falta de significación puede ser debida a que los animales eran muy jóvenes y el periodo de estudio fue muy corto por lo que no se puede registrar efectos a largo plazo.

El gen *YWHAZ* fue el más estable de los genes control estudiados, eligiendo este para normalizar la expresión génica. El efecto de los días de ingesta de vitamina E sobre la expresión génica relativa fue muy significativo para los genes *ELOVL6* y *FADS1* ($P < 0.001$), significativo en *ELOVL5* y *FADS2* ($P < 0.05$), y no significativo para *SCD*. Al categorizar los grupos de vitamina E en tres subgrupos (VE10d, VE20d y VE30d) para poder calcular el cambio de expresión o “fold change” entre los diferentes grupos, se observaron diferencias significativas en la expresión génica relativa entre diferentes tratamientos de los genes *SCD*, *FADS2*, *ELOVL5* y *ELOVL6* (Figura 1). En *SCD*, el grupo VE30d mostró mayores niveles de expresión, 14 veces más que el grupo VE10d ($P = 0.02$), encontrando solo una tendencia con el grupo Alfalfa ($P = 0.06$), lo que parece indicar que la vitamina E modula la expresión de *SCD*. Como en estudios anteriores, se observó que los corderos alimentados con concentrado tenían mayor expresión de *SCD* que los del grupo alfalfa, así como menor contenido de ALC y ácidos grasos omega 3 (Dervishi et al. 2010). La expresión de *ELOVL6*, *ELOVL5* y *FADS2* siguió un mismo patrón, observándose un incremento de la expresión en el grupo VE10d en los tres casos. En el caso de *ELOVL6* y *FADS2* este aumento fue muy significativo ($P < 0.001$), siendo los niveles de expresión del grupo de animales VE10d, 80 y 73 veces más que el grupo Control, respectivamente. Al incrementarse los días de exposición a la vitamina E, la expresión se atenúa, estando el tratamiento VE20d 12 veces más expresado que el grupo Control para *ELOVL6* ($P = 0.008$) y 9 veces más para *FADS2* ($P = 0.01$), no encontrándose diferencias significativas entre VE30d y el grupo Control. Este aumento significativo de la expresión en el grupo VE10d puede estar ligado al incremento que observamos en el contenido de α -tocoferol en el músculo a partir de 7 días de ingesta.

En cuanto al efecto de la expresión génica sobre el contenido de los AGPI sólo se observó que el contenido de EPA estaba influenciado por la expresión génica de *FADS1* ($P = 0.02$). En el presente estudio, el incremento observado en el contenido de EPA, DPA y DHA es principalmente debido a la dieta y no a la síntesis *de novo*, no encontrándose diferencias significativas en estos ácidos grasos en función del tiempo de alimentación con vitamina E.

Estos resultados sugieren que la vitamina E es un posible regulador de la expresión génica de estos genes, modificando su expresión en los animales que han consumido un pienso enriquecido con acetato de α -tocoferol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Daley et al., 2010. Nutrition J. 9. • Dervishi et al., 2010. BMC Vet. Res. 6:40 • Jump 2002. J Biol Chem. 277:8755–8 • Lyan et al., 2001. J. Chrom. B 751(2): 297–303. • Maret et al., 2007. Free Radic. Biol. Med. 43: 4–15 • Nakamura et al., 2009. Journal of Funct. Foods 1(3): 241-242. • Ripoll. et al., 2013. Meat Sci. 93: 906–913 • Serrano et al., 2011. BMC Genetics 12:36 • Steibel et al., 2009. Genomics 94 (2): 146-152. • Woods & Fearo, 2009. Livest. Sci. 126(1–3): 1–20.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por INIA RTA2009-91 RZP-2010-02 y cofinanciado con fondos FEDER. L. González-Calvo recibe una beca de Formación de investigadores de tipo Predoctoral de INIA.

EFFECT OF FINISHING PERIOD LENGTH WITH VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON LONG CHAIN FATTY ACID CONTENT AND EXPRESSION OF GENES RELATED TO LIPID METABOLISM IN L.THORACIS MUSCLE OF LIGHT LAMBS

ABSTRACT. Light lambs (n=62) were allocated in 5 groups: 8 lambs with their dams grazing alfalfa, 12 lambs indoors fed commercial concentrate from weaning to slaughter and the rest of lambs were fed concentrate supplemented with 500 mg of dl- α -tocopheryl acetate/kg concentrate for different days before slaughter (VE10d, VE20d and VE30d), and kept indoors. In *L.thoracis* muscle the period length of supplementation with α -tocopherol had significant influence increasing the content until the end of the study. EPA, DPA and DHA content increased significantly ($P < 0.001$) in alfalfa lambs respect to concentrate lambs. *SCD* expression had higher levels in VE30d. *ELOVL5*, *ELOVL6* and *FADS2* showed similar expression pattern, increasing the expression in VE10d. The data indicated that supplemented diet with vitamin E is a factor affecting *SCD*, *ELOVL6*, *ELOVL5* and *FADS2* gene expression and alfalfa grazing affects PUFA content.

Keywords: *α -tocopherol, vitamin E, gen expression, sheep*

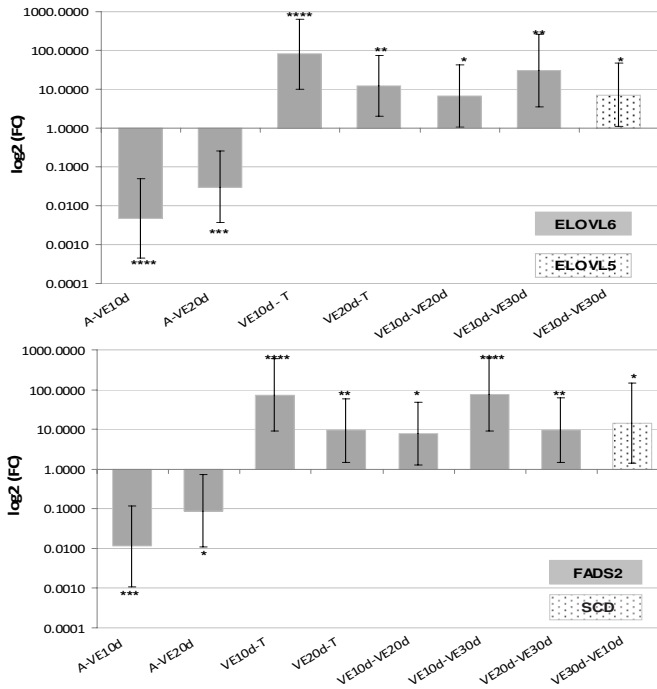


Figura 1. Log2 (FC, Fold change) para los contrastes entre grupos alternativos para ELOVL6, ELOVL5, FADS2 y SCD. Solo se indican contrastes significativos. ($P < 0.05^*$, $P < 0.01^{}$, $P < 0.001^{***}$ y $P < 0.0001^{****}$). Las barras indican el intervalo de confianza al 95% (FC_{up} - FC_{low}).**

EFFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LINO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS LIPOGÉNICAS EN EL TEJIDO GRASO SUBCUTÁNEO E INTRAMUSCULAR DE CORDEROS

Urrutia, O., Soret, B., Mendizabal, J.A, Insausti, K., Purroy, A. y Arana, A.
ETSIA. Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. olaia.urrutia@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n3, sobre todo el ácido linoléico conjugado (CLA), y los ácidos grasos de cadena larga (LCPUFA), se consideran saludables (Wood et al., 2004), por lo que es de interés aumentar su contenido en la carne de los rumiantes. Waters et al. (2009) y Hiller et al. (2011) observaron que la inclusión de semilla de lino, rico en ácido α -linoléico (ALA), en la dieta de terneros provocaba un aumento en el contenido de n3 PUFA, C18:1t11 (VA) y ALA, pero no produjo un aumento del 9c11tCLA (formado a partir del VA) ni de los LCPUFA como el EPA, DPA y DHA (sintetizados a partir del ALA). Esto probablemente se deba a la inhibición que ejercen los PUFA n3 sobre el gen *stearoyl-CoA desaturase (SCD)* y sobre las enzimas implicadas en la biosíntesis de los LCPUFA (*Fatty acid desaturase 1 (FADS1)* y *2 (FADS2)* y *Fatty acid elongase 5 (ELOVL5)*). Además, estos autores observaron que la inclusión de PUFA n3 en la dieta de los animales provocaba una regulación diferente, tanto a nivel genómico como proteico, de las enzimas implicadas en la lipogénesis en los depósitos grasos subcutáneo (SC) e intramuscular (IM). Por otro lado, Arana et al. (1998) constataron que los procesos de hipertrofia e hiperplasia contribuyen de forma diferente al desarrollo de los depósitos grasos SC e IM. Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de la inclusión de lino en la dieta de corderos sobre la expresión de genes lipogénicos en los tejidos SC e IM y analizar si la expresión de estos genes sigue un patrón diferente en cada depósito.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 33 corderos machos de raza Navarra distribuidos en tres grupos (n=11) y alimentados con distintos piensos isoproteicos: Lote control (C; concentrado comercial, %ALA=4,43); Lote L-5 (pienso con un 5% de semilla de lino, %ALA=18,96); Lote L-10 (pienso con un 10% de semilla de lino, %ALA=33,49). El crecimiento, la grasa acumulada y las características de la canal de los corderos de los tres lotes fueron similares (Arana et al., 2010). Tras el sacrificio de los corderos (26 kg), se tomaron muestras de grasa SC e IM (músculo *longissimus dorsi*). Se determinó el diámetro de los adipocitos (Arana et al., 1998) y el análisis de ácidos grasos (AGs) se realizó por el método descrito en Aldai et al. (2005). La extracción de ARN total y la síntesis del ADNc se realizaron mediante kits comerciales. Los genes estudiados fueron: *Acetil-CoA carboxylase (ACACA)*, *Lipoprotein lipase (LPL)*, *SCD*, *FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5*; como control endógeno se utilizó la β -actina. Las reacciones de amplificación, usando *pool*es de cada uno de los lotes, se realizaron en un volumen total de 25 μ l (5 μ l de ADNc, 5 μ M de cada oligonucleótido y 5 μ l SYBR Premix Ex Taq (Takara)). La cuantificación relativa de la expresión (método $\Delta\Delta$ Ct) y el análisis estadístico se realizó con el programa REST© algorithm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en la Tabla 1, no se observaron diferencias entre los lotes de corderos en el tamaño de los adipocitos de ambos depósitos, lo que concordaría con el hecho de que la cantidad de grasa sea similar. Los adipocitos del depósito SC fueron de mayor tamaño que los del depósito IM, indicando que en el depósito SC es más importante la hipertrofia celular (mayor acumulación de lípidos neutros) mientras que en el depósito IM interviene más la hiperplasia (células de menor tamaño) y por tanto la contribución de los PUFA a los fosfolípidos (PL) de las membranas de los adipocitos representaría un mayor porcentaje. En ambos depósitos aumentó significativamente el % de ALA, de VA y de n3, disminuyendo el % de LA y de n6 en el lote L10 (P<0,001). Los % de CLA, EPA, DPA Y DHA no cambiaron al incluir lino en la dieta de los corderos. En ambos depósitos se observó una disminución de la síntesis de LCPUFA n3 (P<0,001) mientras que la formación de n6 LCPUFA no varió en ambos depósitos respecto al lote control. El hecho de que la biosíntesis de los n6 LCPUFA no disminuyera, como ocurrió en el caso de los n3, podría ser indicativo del importante papel que los AGs n6 juegan en la composición de los PL de las membranas celulares. Por otro

lado, un menor valor del ratio n6/n3 y el mayor contenido en n6 LCPUFA en el depósito IM indicarían que la biosíntesis de estos AGs tendría una mayor relevancia debido a que este depósito presenta células más pequeñas y por tanto, mayor superficie de membrana celular, a igual cantidad de grasa, que el depósito SC.

En la Tabla 2 se muestra la expresión de los principales genes lipogénicos de los corderos de los tres lotes. Los resultados de la expresión del gen *LPL*, enzima responsable de la captación de AGs exógenos, muestran un mismo patrón en ambos depósitos. La mayor disponibilidad de AGs provenientes de los piensos suplementados con un 5% de lino, habría provocado el incremento de la expresión del gen respecto al lote C.

Por otro lado, la incorporación más alta de dichos AGs exógenos habría provocado la disminución en la biosíntesis de AGs en ambos depósitos, mediante la represión de la expresión génica de la *ACACA*, implicada en la síntesis de AGs *de novo*.

En cuanto al gen *SCD*, la mayor concentración de PUFA n3 provocó una represión de su expresión en los dos depósitos que, posiblemente, evitó un aumento en el contenido en 9c11tCLA a pesar del aumento de VA (*L-5* y *L-10*) (Tabla 1).

La expresión de los genes implicados en la biosíntesis de LCPUFA (*FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5*) fue diferente en cada depósito graso cuando se incluyó lino en la dieta. En el tejido graso SC, no causó variación en la expresión de ninguno de los genes. En cambio, en el tejido IM, se observó una inhibición en la expresión de *FADS1* y *FADS2*. La respuesta observada en el tejido IM pero no en el SC, podría tener como fin mantener la composición de AGs de las membranas celulares ya que los adipocitos IM tienen menor capacidad de almacenamiento de AG n3; así no se alteraría ni su fluidez ni su función fisiológica.

En definitiva, podría concluirse que en esta experiencia la expresión de los genes implicados en la formación de AGs saturados y monoinsaturados (*ACACA* y *SCD*) sigue un mismo patrón tanto en el depósito graso SC como IM. Sin embargo, la expresión de los genes encargados de la biosíntesis de LCPUFA tendría una regulación diferente en cada depósito adiposo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Arana, J. A. Mendizábal, K. Insausti, F. Maeztu, P. Eguinoa, V. Sarries, M.J. Beriain, B. Soret y A. Purroy. 2010. 61st annual meeting of EAAP, Heraklion, Crete, Greece 23-26 August.
- A. Arana, B. Soret, J. A. Mendizabal, M. Corroza, P. Eguinoa y A. Purroy. 1998. *Anim. Sci.* 66: 409-413.
- Aldai, N., B.E. Najera, A. I., Troy, D.J y Osoro, K. 2005. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. *J. Sci. Food Agr.* 85: 1073-1083.
- Hiller, B., A. Herdmann y K. Nuernberg. 2011. *Lipids*: 1-11.
- Waters, S. M., J. P. Kelly, P. O'Boyle, A. P. Moloney y D. A. Kenny. 2009. *J. Anim. Sci.* 87: 244-252.
- Wood, J. D., R. I. Richardson, G.R. Nute, A. V. Fisher, M.M. Campo, E. Kasapidou, P.R. Sheard y M. Enser. 2004. *Meat Sc.* 66: 21-32.

Tabla 1. Diámetro de los adipocitos (μm) y composición de los ácidos grasos (%) del depósito graso subcutáneo (SC) e intramuscular (IM) de los corderos en función de la dieta (C: pienso comercial; L-5: 5% de lino; L-10: 10% de lino).

	C	L-5	L-10	E.E.	P
<i>Diámetro de los adipocitos</i>					
Tejido SC	80,1	85,7	79,3	3,5	0,46
Tejido IM	33,5	35,7	35,8	0,23	0,62
<i>Composición de ácidos grasos</i>					
<i>Tejido SC</i>					
C18:1t11 (VA)	8,88 ^b	10,92 ^a	11,85 ^a	0,567	0,003
C18:2n6c9c12 (LA)	4,36 ^a	3,00 ^b	2,61 ^b	0,193	<0,001
C18:3n3c9,c12,c15 (ALA)	0,64 ^b	1,10 ^a	1,18 ^a	0,087	<0,001
C20:5n3 (EPA)	0,02	0,01	0,02	0,000	0,688
C22:5n3c7,c10,c13,c16,c19 (DPA)	0,04	0,03	0,03	0,003	0,273
C22:6n3c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	-	-	-		
n6	4,94 ^a	3,63 ^b	3,48 ^b	0,193	<0,001
n3	0,89 ^b	1,33 ^a	1,49 ^a	0,090	<0,001
CLA	0,29	0,26	0,31	0,020	0,204

Índice n3, (EPA+DPA+DHA)/ALA	0,08 ^a	0,04 ^b	0,04 ^b	0,005	<0,001
Índice n6, (γ-LA+C20:3+AA+C22:4)/LA	0,07 ^b	0,08 ^{ab}	0,09 ^a	0,005	0,038
Tejido IM					
C18:1t11 (VA)	4,69 ^b	5,82 ^{ab}	7,10 ^a	0,423	<0,001
C18:2n6c9c12 (LA)	7,10 ^a	6,28 ^{ab}	5,68 ^b	0,340	0,019
C18:3n3c9,c12,c15 (ALA)	0,47 ^b	0,92 ^a	1,11 ^a	0,080	<0,001
C20:5n3 (EPA)	0,11	0,12	0,15	0,017	0,278
C22:5n3c7,c10,c13,c16,c19 (DPA)	0,14	0,13	0,11	0,020	0,417
C22:6n3c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	0,05	0,02	0,02	0,000	0,186
n6	9,50 ^a	8,49 ^{ab}	7,88 ^b	0,467	0,058
n3	0,83 ^b	1,35 ^a	1,58 ^a	0,087	<0,001
CLA	0,30	0,28	0,28	0,023	0,776
Índice n3, (EPA+DPA+DHA)/ALA	0,59 ^a	0,27 ^b	0,26 ^b	0,055	<0,001
Índice n6, (γ-LA+C20:3+AA+C22:4)/LA	0,31	0,32	0,31	0,014	0,761

Tabla 2. Expresión de genes lipogénicos del depósito graso subcutáneo (SC) e intramuscular (IM) de los corderos en función de la dieta (L-5: 5% de lino; L-10: 10% de lino).

Gen	Tejido	Lote	Expresión	Error Estándar	P(H1)*	Resultado L5/L10
<i>β Actina</i>			1			
ACACA	SC	L-5/ L-10	0,647/0,29	0,123-2,849/0,049-1,265	0,243/0,001	/Down
	IM	L-5/ L-10	0,009/0,002	0,002-0,044/0,001-0,011	0/0	Down/Down
LPL	SC	L-5/ L-10	3,48/1,254	1,738-6,850/0,577-2,664	0/0,197	Up/
	IM	L-5/ L-10	4,347/1,282	1,665-16,19/0,384-3,513	0,005/0,706	Up/
SCD	SC	L-5/ L-10	1,269/0,355	0,608-2,482/0,141-0,823	0,169/0	/Down
	IM	L-5/ L-10	0,602/0,282	0,180-2,083/0,096-0,826	0,154/0	/Down
FASD1	SC	L-5/ L-10	0,432/0,606	0,166-1,474/0,209-1,589	0,169/0,373	/
	IM	L-5/ L-10	0,068/0,053	0,014-0,498/0,005-0,457	0/0,003	Down/Down
FASD2	SC	L-5/ L-10	0,541/0,411	0,177-1,391/0,124-1,479	0,299/0,129	/
	IM	L-5/ L-10	0,1/3,063	0,024-0,302/1,152-9,205	0,007/0,12	Down/
ELOVL5	SC	L-5/ L-10	1,499/0,305	0,353-2,969/0,053-1,853	0,397/0,255	
	IM	L-5/ L-10	No detectado			

*P (H1): Probabilidad de la hipótesis alternativa de que la diferencia entre los lotes con lino y el control sea solamente por azar.

EFFECT OF LINSEED INCLUSION ON THE GENE EXPRESSION OF LIPOGENIC ENZYMES IN SUBCUTANEOUS AND INTRAMUSCULAR ADIPOSE TISSUE OF LAMBS

ABSTRACT: The aim of this work was to study the effect of the inclusion in the diet of linseed, rich in α-linolenic acid (ALA), on the gene expression of lipogenic enzymes in subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) adipose tissue in 3 groups of lambs: C (concentrate), L-5 (concentrate+5% of linseed) and L-10 (concentrate+10% of linseed). The expression of *Acetyl-CoA carboxylase (ACACA)*, *Lipoprotein lipase (LPL)*, *stearoyl-CoA desaturase (SCD)*, *Fatty acid desaturase 1 (FADS1)* and *2 (FADS2)* and *Fatty acid elongase 5 (ELOVL5)* were quantified by real time RT-PCR.

The inclusion of linseed caused a decrease in the *ACACA* and *SCD* gene expression ($P < 0.001$) and *LPL* gene expression was higher in L-5 group than in the L-10 and C groups ($P < 0.001$) in both depots. The results showed that the gene expression of some genes has a tissue-specific regulation when linseed is included in the diet: the expression of *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5* genes did not change in the SC tissue whereas in the IM tissue mRNA the quantity of some of these genes decreased probably due to the inhibitory effect of ALA.

Keywords: fatty acids, linseed, lamb, lipogenic gene expression

PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADOS A PH MUSCULAR 24H POST-MORTEM EN PORCINO

Pena^{1,2}, R.N., Ibáñez¹, N., Fernández³, A.I., Folch^{4,5}, J.M., Casellas¹, J. y Noguera¹, J.L.

¹IRTA, Genètica i Millora Animal, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida; ²Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida; ³Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Crta. Coruña km 7.5, 28040 Madrid; ⁴Centre de Recerca en Agrigenòmica (Consorti CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus UAB, 08193 Bellaterra;

⁵Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. romi.pena@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El músculo de los animales sufre después del sacrificio una serie de cambios bioquímicos que confieren a la carne sus propiedades de color, sabor, aroma y jugosidad. Estos cambios se conocen globalmente como maduración de la carne. Tras el sacrificio se incrementa progresivamente la cantidad de ácido láctico muscular al consumir las propias reservas de glucógeno, lo que provoca un descenso progresivo del pH muscular. El valor óptimo de pH 24 horas post-mortem (pH-24) para la correcta maduración de la carne se encuentra alrededor de 5,5. Valores superiores o inferiores se asocian a alteraciones en las propiedades organolépticas de la misma. El pH-24 depende de factores ambientales como el estrés del animal pero tiene también una fuerte componente genética. Se conocen algunos genes mayores con efectos importantes sobre estos parámetros (p.ej.: *RYS1*, la mutación del cual provoca el síndrome del estrés porcino). Sin embargo, tenemos un gran desconocimiento sobre las redes de interacción génica que intervienen en la caída del pH-24 muscular. Este trabajo tiene como objetivo dar un primer paso hacia este conocimiento a partir perfiles de transcriptómicos de músculo porcino *longissimus thoracis* (*Lt*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y datos fenotípicos: En este estudio se utilizaron 110 animales procedentes de un retrocruce experimental (RC2) Ibérico (25%) x Landrace (75%) mantenidos en condiciones estándar de manejo y alimentación y sacrificados a una edad media de 179.9 ± 2.6 días. Teniendo en cuenta la gran influencia de la gestión ante-mortem en la calidad de la carne se observaron estrictamente las pautas de manejo durante el viaje y espera en el matadero. El pH-24 fue medido directamente en el músculo *Lt* refrigerado a 4°C. En el matadero se tomaron muestras del músculo *Lt* que fueron congeladas en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su análisis.

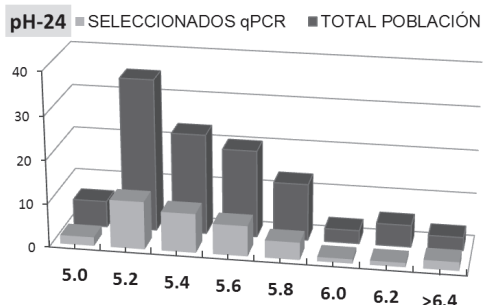
Aislamiento de ARN e hibridación en *microarrays*: Se aisló ARN total del músculo *Lt* utilizando el kit RiboPure (*Ambion*). Tras un análisis de calidad del mismo, el ARN total de 108 muestras de *Lt* se hibridó individualmente en GeneChip Porcine Genome *microarrays* (*Affymetrix*) siguiendo los protocolos desarrollados por esta casa comercial.

Análisis entre el pH-24 y los datos de expresión génica: Tras un análisis de calidad aplicando los paquetes de AFFY y SIMPLAFFY del Bioconductor (Gentleman et al., 2004), los datos de 103 *microarrays* fueron normalizados con el algoritmo gcRMA y un total de 5.637 sondas fueron escogidas para los análisis estadísticos. El modelo utilizado para identificar genes con patrones de expresión relacionada con el pH-24 fue un modelo mixto con covariable continua. Se asumió una varianza del error homogénea y se consideraron los factores: media de cada sonda (103 individuos), lote de sacrificio (3 niveles) y sexo (2 niveles). El modelo fue resuelto mediante el programa GEAMM v4 (Casellas et al., 2008). Como criterio para seleccionar los genes que muestran cambios en su patrón de expresión en relación al pH-24, se aplicó la corrección por contraste múltiple mediante el *False Discovery Rate* (*q*-value <0.1) propuesto por Benjamini y Hochberg (1995).

Anotación funcional de los genes correlacionados con el pH-24: Con el fin de resumir la funcionalidad de los genes de expresión correlacionada con el pH-24 se realizó, mediante la base de datos *Reactome* (<http://www.reactome.org>), un análisis funcional *in silico* de términos ontológicos asociados y su distribución en vías metabólicas (base de datos KEGG).

Validación de los resultados por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR): Para este experimento se tomó un subgrupo de 36 animales representativos de los datos globales de pH-24 de la población (**Figura 1**). Se seleccionaron inicialmente seis genes según su función, representando a varias rutas metabólicas y de regulación génica muscular (**Figura 2**). El ARN muscular (1 µg) fue retrotranscrito con hexámeros aleatorios y retrotranscriptasa Revert-Aid (*Fermentas*) 1h a 42°C. La reacción de amplificación se realizó por triplicado y contenía 1x SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*), 200 nM de *primers* y 3 µl de ADNc diluido 1:30, con el siguiente ciclo de temperaturas: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. La cuantificación y normalización de los datos se realizó por el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando dos genes de referencia (*HPRT* y *RPL32*). Los valores de expresión de cada gen obtenidos en este ensayo fueron validados ajustando el mismo modelo mixto utilizado en los análisis de los datos de expresión procedentes del *microarray*.

Figura 1. Distribución de los animales en la población RC2 y en el subgrupo de animales seleccionados para el experimento de validación por qPCR, en relación a sus valores de pH muscular 24h post-mortem



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rutas metabólicas y de regulación génica relacionadas con el pH-24:

A partir de los perfiles transcriptómicos globales del músculo *Lt* de 103 cerdos retrocruzados hemos identificado un total de 827 sondas correlacionadas con el pH-24 (FDR<0.1) que corresponden, tras su anotación, a 722 genes únicos. La clasificación funcional de estos genes muestra varias rutas involucradas en la adaptación del músculo a situaciones de hipoxia (**Figura 2**). Por una parte, la falta de oxígeno imposibilita la obtención de energía a través de la glucólisis aeróbica (respiración oxidativa mitocondrial). Como mecanismo compensatorio se activa la glucólisis anaeróbica donde el piruvato se transforma en lactato, ATP y H⁺, alterando el pH celular. Este paso se retroalimenta por la activación de canales iónicos por las altas concentraciones de lactato, lo que incrementa la demanda energética al promover la contracción muscular. Otras fuentes de H⁺ activadas por la hipoxia son las ATPasas y kinasas. Por otra parte, otro grupo de mecanismos activado en estas condiciones son las respuestas al estrés celular, incluyendo el control de la apoptosis (regulación del proteosoma, reparación del ADN) y la regulación de la expresión de genes. Esta regulación se da tanto a nivel transcripcional, activando genes relacionados con la supervivencia celular, como post-transcripcional, modificando la traducción de los ARNm para adaptar la producción de proteínas a la demanda metabólica. Es notable que en la lista de 722 genes cuya expresión se correlaciona con el pH-24 se vean representadas todas estas rutas (**Figura 2**). Este hecho indica que los cambios transcripcionales (sobre la actividad de los genes) y post-transcripcionales (sobre los ARNm) se ejercen sobre genes con funciones tanto metabólicas como de regulación. Dos hechos son destacables: por un lado, la gran presencia de factores de transcripción (unos 120 genes) y, por otro, la casi ausencia de proteínas estructurales, indicando su escasa relación con la supervivencia del músculo a la hipoxia celular. Actualmente estamos validando algunos de estos resultados en genes representativos de las rutas más relevantes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (**Tabla 1**). Los primeros resultados muestran que, aunque se valida la correlación entre la expresión de algunos de estos genes y el pH-24, existe una baja correlación entre los datos de expresión medidos por qPCR y por hibridación en microarrays (**Tabla 1**).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. *J R Stat Soc Series B Methodol* 57: 289–300 • Casellas J, et al. 2008. *Anim Genet* 39: 89-90 • Gentleman RC, et al. 2004. *Genome Biol* 5: R80 •

Agradecimientos: Financiado por el proyecto MICINN AGL2008-04818-C03/GAN.

Tabla 1. Coeficiente de regresión (*b*) entre la expresión génica y el pH muscular 24h post-mortem en datos de expresión obtenidos por microarray (mA) y PCR cuantitativa (qPCR) y coeficiente de correlación de Spearman (*r*) entre ambos grupos de datos.

Acónimo	Gen	microarray		qPCR		r (mA, qPCR)	
		b	p-value	b	p-value	r	p-value
IRS2	Insulin receptor substrate 2	0.458	0.00004	72.25	0.042	0.295	0.075
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	0.478	0.00006	317.04	0.002	0.866	<0.0001
PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	0.489	0.00008	54.35	0.012	0.711	<0.0001
SLC2A12	Solute carrier family 2 (glucosetransporter), member 12	-0.336	0.0013	41.69	0.150	0.045	0.789
ATP6V0B	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit b	0.267	0.0023	65.06	0.038	0.192	0.255
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase 3	0.334	0.0034	185.34	0.003	0.811	<0.0001

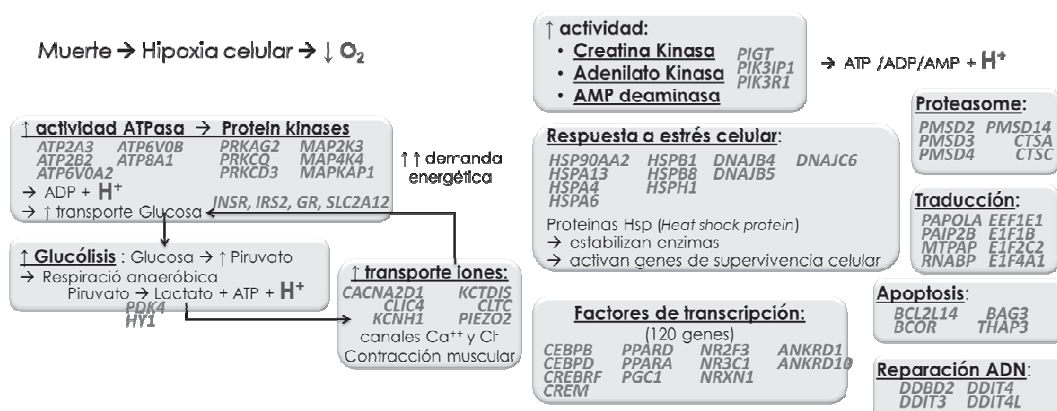


Figura 2: Esquema de las rutas metabólicas y de regulación génica relacionadas con el pH muscular 24h post-mortem. Los acrónimos corresponden a los genes más relevantes identificados en cada función.

GENE EXPRESSION PROFILES ASSOCIATED WITH MUSCULAR PH AT 24H POST-MORTEM IN SWINE

ABSTRACT: At slaughter the muscle of livestock animals undergoes biochemical changes that give the meat its colour, flavour, aroma and juiciness. These include a gradual accumulation of lactic acid by consuming muscle glycogen, leading to a drop in muscle pH. The optimal pH 24 h *post-mortem* (pH-24) for proper maturation of meat is about 5.5. Higher or lower values are associated with alterations in the organoleptic properties. The pH-24 depends on environmental factors but also has a strong genetic component, although there is little knowledge about gene interaction networks involved in the drop of muscular pH. Using global transcriptomic data of *longissimus thoracis* muscle of 103 backcrossed pigs we identified 827 probes correlated with pH-24 (FDR <0.1) corresponding to 722 unique genes. Functional classification of these genes shows a net of pathways involved in muscle adaptation to hypoxia, which includes the activation of anaerobic glycolysis, regulation of apoptosis (proteasome regulation, DNA repair) and of gene expression at transcriptional and post-transcriptional level by activating genes related to cell survival and adapting protein production to the metabolic needs. Two facts are remarkable: first, the large presence of transcription factors (120 genes) and, second, the near absence of structural protein, indicating a poor relationship with the response to hypoxia.

Keywords: ultimate pH, muscle, transcriptomics, pig

VARIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DEL MÚSCULO PORCINO EN ANIMALES CON FENOTIPOS EXTREMOS PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Puig-Oliveras, A.^{1,2}, Ramayo-Caldas, Y.^{1,2}, Corominas, J.^{1,2}, Castelló, A.¹, Pérez-Montarelo, D.³, Casellas, J.⁴, Folch, J.M.^{1,2}, Ballester, M.¹

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica, CSIC-IRTA-UAB-UB, edifici CRAG, Campus UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.

³Departamento Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. Coruña Km7.5, 28040 Madrid.

⁴Genètica i Millora Animal, IRTA, Av. Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

anna.puig@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

Los avances en las técnicas de secuenciación masiva y el correspondiente manejo de gran volumen de datos nos permiten explorar el transcriptoma de forma cada vez más rápida y precisa (Trapnell et al., 2012). La metodología de RNA-Seq permite estimar la expresión génica a partir del número de secuencias mapeadas para cada transcrito y aporta, además, información sobre nuevos genes, procesamiento alternativo del ARNm, utilización de diferentes promotores y señales de terminación de la transcripción. Sin embargo, actualmente existen pocos trabajos donde se haya analizado el transcriptoma de animales de interés productivo como el cerdo (Esteve-Codina et al., 2011; Chen et al., 2011; Ramayo-Caldas et al., 2012b; Yu et al., 2013).

La composición de ácidos grasos en el músculo es especialmente importante en la determinación de la ternura y el sabor de la carne, afectando a su estabilidad oxidativa durante el procesado de los productos curados (Wood et al., 2008). Además, ha adquirido recientemente una mayor importancia debido a su impacto sobre la salud humana (Yu et al., 2013). Se trata de un carácter complejo, determinado por factores ambientales, como la dieta, y múltiples factores genéticos. La importancia de esta base genética resulta evidente en la comparación de las diferentes razas porcinas y en la identificación de QTLs para la composición de ácidos grasos.

El objetivo del presente trabajo consiste en analizar el transcriptoma del músculo en cerdos (25% Ibérico, 75% Landrace) con fenotipo extremo para la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular. Los resultados obtenidos nos pueden ayudar en la identificación de los genes y redes génicas implicados en la regulación de la composición y el metabolismo de los ácidos grasos en músculo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: El material utilizado en este trabajo procede de un cruce entre 3 machos Ibéricos (Guadyervas) con 31 madres Landrace (Pérez-Enciso et al., 2000). Cinco animales de la generación F1 fueron cruzados con 26 madres Landrace obteniendo 144 animales (BC1_LD). Se recogieron muestras del músculo *Longissimus dorsi* de estos animales que fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

Se seleccionaron 12 animales BC1_LD pertenecientes a dos grupos extremos, *Low* (L) y *High* (H), a partir del primer componente de un análisis de componentes principales para la composición de ácidos grasos en músculo (Ramayo et al., 2012b). Con el objetivo de eliminar la variabilidad atribuible al sexo, sólo se seleccionaron hembras.

Extracción de ARN y secuenciación: Se aisló el ARN total a partir de las muestras del músculo *Longissimus dorsi* de los 12 animales seleccionados utilizando el *kit RiboPure™* (Ambion). El ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop products). La pureza y la integridad del ARN se verificaron utilizando un *Bioanalyzer-2100* (Agilent Technologies). Las secuencias se generaron en el *CNAG* (Centro Nacional de Análisis Genómico) utilizando un equipo *Hi-Seq 2000* (Illumina) con una longitud de 75 pb y extremos pareados.

Mapeo y anotación de las lecturas: Se utilizó el programa *FASTQC* para el control de calidad de las lecturas [<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>]. Las lecturas fueron indexadas con *BOWTIE 2.0.0-beta7* (Langmead et al., 2009) y a su vez mapeadas contra la secuencia de referencia del genoma del cerdo (*Sscrofa10.2*), utilizando el programa *TopHat v2.0.1* (Trapnell et al., 2009) con un máximo de tolerancia de dos nucleótidos distintos por cada lectura. Los archivos *bam* resultantes que contenían las

secuencias alineadas, se fusionaron mediante el programa *Samtools* (Li et al., 2009). Se anotaron las lecturas utilizando la opción *intersectBed* del programa *BEDtools* (Quinlan et al., 2010). Los transcritos fueron ensamblados con el programa *Cufflinks* (Trapnell et al., 2010) y *Samtools* fue empleado para determinar los estadísticos relacionados con el mapeo.

Análisis de genes diferencialmente expresados: El número de lecturas que mapean en cada gen fue determinado con el programa *Qualimap v0.5* (García-Alcalde et al., 2012). Para identificar los genes expresados diferencialmente entre grupos se utilizaron los paquetes *DESeq* (Anders et al., 2010) y *EdgeR* (Robinson et al., 2010), seleccionando aquellos genes con un *fold change* $\geq 1,2$ y un *p-value* $\leq 0,01$ (equivalente a un FDR $\leq 0,1$). Finalmente, se identificaron las funciones biológicas más relevantes mediante *FatiGO* de *Babelomics 4.3* [<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>] (FDR $< 0,1$) utilizando como bases de datos *KEGG* (<http://www.genome.jp/kegg>), *Reactome* (<http://www.reactome.org>) y *GO* (<http://www.geneontology.org>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Doce muestras del músculo *Longissimus dorsi* de hembras con fenotipos extremos para la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular fueron analizadas mediante RNA-Seq en un Hi-Seq de Illumina. Se obtuvieron un total de 787,5 M de lecturas pareadas de 75 pb. El 84,3% (75,3%-86,6%) de los transcritos fueron asignados al genoma de referencia, de los cuales, aproximadamente el 13,8%, no tuvieron una localización única. El porcentaje de lecturas mapeadas fue mayor que el descrito previamente (71,4%-77,7%) por Ramayo-Caldas et al. (2012b) en un análisis del transcriptoma de hígado. Esta diferencia podría deberse al uso de distintas versiones del genoma de referencia, mientras que Ramayo-Caldas et al. (2012b) utilizó la versión *Sscrofa 9.61*, en el presente trabajo se ha utilizado la versión más reciente *Sscrofa 10.2*. Del total de lecturas mapeadas, el 85,9% correspondió a genes anotados, el 93,0% se localizó en exones y sólo el 7,0% en intrones. El 14,1% de las lecturas mapearon en regiones intergénicas, lo que indica que se localizan en genes o exones de genes no anotados en el genoma de referencia.

Una vez ensamblados los transcritos, el 60,8% de las lecturas mapearon sobre exones. El 21,3% se identificaron como posibles nuevas isoformas y un 16,4% como transcritos intergénicos. Se identificaron un total de 314 genes diferencialmente expresados entre grupos con *EdgeR* y 208 con *DESeq*. Para identificar las rutas metabólicas más sobrerrepresentadas se seleccionaron los 131 genes que resultaban diferencialmente expresados por los dos programas (Figura 1). Dieciocho corresponden a genes candidatos localizados en regiones genómicas asociadas con la composición de ácidos grasos en músculo en un estudio GWAS (Ramayo-Caldas et al., 2012a). Las rutas metabólicas más sobrerrepresentadas fueron la ruta de señalización de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y la de la insulina (*KEGG*), ambas vías relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos, la ruta del metabolismo de lípidos y lipoproteínas (*Reactome*) y el desarrollo del músculo (*GO*) (Tabla 1). Estos resultados se ajustan con los descritos por Ramayo-Caldas et al. (2012b) analizando el transcriptoma del hígado, donde la señalización del PPAR se identificó como una de las principales rutas metabólicas. Por tanto, estos resultados concuerdan con las diferencias fenotípicas de los animales analizados.

Debido al gran impacto que la composición de ácidos grasos tiene sobre la calidad de la carne, estos resultados pueden ser de gran valor económico en los programas de selección para la industria porcina con el fin de mejorar la calidad de la carne desde el punto de vista sensorial y nutricional. El conocimiento de las rutas metabólicas de los ácidos grasos en cerdo y su regulación, puede servir también como modelo para enfermedades humanas como la obesidad o la diabetes (Chen et al., 2011).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S. y Huber, W. 2010. *Genome Bio.* 11(10):R106.
- Chen, C., Ai, H., Ren, J. et al. 2011. *BMC Genomics* 12(1):448.
- Esteve-Codina, A., Kofler, R., Palmieri, N. et al. 2011. *BMC Genomics* 12(1):552.
- Langmead, B., Trapnell C., Pop, M. et al. 2009. *Genome Biol.* 10:R25.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A. et al. 2009. *Bioinformatics* 25(16):2078-2079.
- Pérez-Enciso M., Clop A., Noguera J. L. et al. 2000 *Journal of Animal*

Science 78: 2525-31. • Quinlan, A.R. y Hall, I.M. 2010. *Bioinformatics* 26(6):841–842. • Ramayo-Caldas, Y., Mercadé, A., Castelló, A. et al. 2012a. *J. Animal Sci* 90:1-11. • Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Esteve-Codina, A. et al. 2012b. *BMC genomics* 13:547. • Robinson, M.D., McCarthy, D.J. y Smyth, G.K. 2010. *Bioinformatics* 26(1):139-140. • Trapnell, C., Pachter, L. y Salzberg, S.L. 2009. *Bioinformatics* 25(9):1105-1111. • Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G. et al. 2010. *Nat. Biotechnol.* 28:511-515. • Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., et al. 2012. *Nature protocols* 7(3):562-578. • Wood, J.D., Enser, M., Fisher A.V. et al. 2008. *Meat Science* 78:343-358. • Yu, K., Shu, G., Yuan, F. et al. 2013. *Int. J. Biol. Sci.* 9(1):108-118.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-29821-C02 (Ministerio de Economía y Competitividad) y por el Programa de Innovación Consolidar-Ingenio 2010 (CSD2007-00036). A. Puig-Oliveras ha sido financiada con una beca de la Universidad Autónoma de Barcelona (PIF, 458-01-1/2011), Y. Ramayo-Caldas con una beca FPU (AP2008-01450) y J. Corominas con una beca FPI (BES-2009-018223).

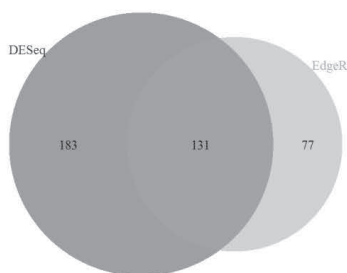


Figura 1. Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados utilizando los programas DESeq y EdgeR.

Tabla 1. Rutas metabólicas sobrerrepresentadas utilizando el programa Babelomics 4.3 de los genes diferencialmente expresados entre los dos grupos con fenotipos extremos para la composición intramuscular de ácidos grasos.

Ruta Metabólica	Base de datos	Nº genes	Significación (p-value)
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	KEGG	3	6,2x10 ⁻⁴
Vía de señalización del PPAR	KEGG	4	7,0x10 ⁻⁴
Vía de señalización de la insulina	KEGG	5	1,5x10 ⁻³
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	Reactome	6	1,6x10 ⁻⁴
Hemostasis	Reactome	7	4,8x10 ⁻⁴
Respuesta a sustratos orgánicos	GO	24	3,4x10 ⁻⁷
Desarrollo del órgano muscular	GO	12	3,6x10 ⁻⁵
Biosíntesis de carbohidratos	GO	8	1,4x10 ⁻⁴
Respuesta a estímulos hormonales	GO	16	2,5x10 ⁻⁴

SWINE MUSCLE TRANSCRIPTOME VARIATION IN PHENOTIPICALLY EXTREME ANIMALS FOR FATTY ACIDS COMPOSITION

ABSTRACT: The aim of this study was to explore the muscle (*Longissimus dorsi*) transcriptome and to identify differentially expressed genes among pigs with extreme phenotypes for muscle fatty acid profile. Here, we sequenced the muscle transcriptome of 12 females with divergent phenotypes belonging to an Iberian X Landrace backcross. Differential expression analysis identified 131 genes. Pathway analysis revealed that the most statistically significant metabolic pathways were PPAR signalling, insulin signalling, as well as, metabolism of lipids and lipoproteins. Moreover, 18 of the differentially expressed genes were located in genomic regions associated with muscle fatty-acid composition in a GWAS study. The overrepresented pathways are in concordance with the phenotypic differences observed among the analysed animals. Because fatty acid composition has a great impact on meat quality in terms of taste and nutritional value, the study of muscle transcriptome may be important for both consumers and producers.

Keywords: RNA-Seq, *Longissimus dorsi*, differential expression, fatty acid composition

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL TRANSCRIPTOMA DEL TEJIDO ADIPOSO ENTRE CERDOS CON FENOTIPOS EXTREMOS PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN GRASA INTRAMUSCULAR

Corominas, J.^{1,2}, Ramayo-Caldas, Y.^{1,2}, Puig-Oliveras, A.^{1,2}, Estellé, J.^{3,4,5}, Castelló, A.¹, Alves, E.⁶, Pena, R.N.⁷, Ballester, M.¹ y Folch, J.M.^{1,2}

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra, 08193. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ³INRA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI), Equipe Génétique Immunité Santé, Jouy-en-Josas F-78352. ⁴AgroParisTech, UMR 1313 GABI, Jouy-en-Josas F-78352.

⁵CEA, DSV/iRCM/SREIT/LREG, Jouy-en-Josas F-78352. ⁶Departamento Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. Coruña Km7.5, 28040 Madrid. ⁷Genètica i Millora Animal, IRTA, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

E-mail: Jordi.corominas@uab.es.

INTRODUCCIÓN

La selección artificial realizada en las especies porcinas comerciales ha provocado cambios en la composición de ácidos grasos de la carne, alterando así su valor nutricional y sus propiedades tecnológicas. Los órganos encargados de regular el balance de ácidos grasos son principalmente el hígado y el tejido adiposo, siendo este último el más importante en cerdos (O'Hea y Leveille, 1969). Por tanto, resulta de gran interés el análisis del transcriptoma del tejido adiposo por su implicación en la determinación de la calidad de la carne porcina. Actualmente, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) permiten el análisis completo del transcriptoma en diferentes individuos con el objetivo de estudiar la variabilidad, tanto funcional como estructural, entre poblaciones o grupos de animales seleccionados. Recientemente, nuestro grupo ha analizado el transcriptoma del hígado en 10 cerdos procedentes de un cruce experimental entre Ibérico y Landrace con fenotipos extremos para la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular (Ramayo-Caldas et al., 2012a). En el presente trabajo se ha secuenciado el transcriptoma del tejido adiposo (grasa dorsal) en 12 animales de la misma población con el objetivo de identificar genes diferencialmente expresados y vías metabólicas relacionadas con diferencias fenotípicas y genéticas observadas en la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: La población utilizada procede de un retrocruce (BC1-LD) entre verracos F1 (Ibérico x Landrace) y cerdas Landrace. Para este estudio se seleccionaron un total de 12 animales con fenotipos extremos para la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular del músculo *longissimus dorsi*: grupos *Low* (L) y *High* (H). La extracción de ARN total del tejido adiposo (grasa dorsal) se realizó con el kit *RiboPure™ Isolation of High Quality Total RNA (Ambion)*.

Análisis de transcriptoma por RNA-seq: La secuenciación se realizó en el CNAG (*Centro Nacional de Análisis Genómico*). Se generó una genoteca *paired-end* para cada animal, con insertos de aproximadamente 300 pb, utilizando el *TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina)*. Las genotecas fueron secuenciadas en un equipo *Illumina HiSeq2000*, mediante lecturas de 2x75 pb. Se generaron un total de 462 millones de lecturas.

Mapeo y ensamblaje de lecturas: El programa *FASTQC* fue utilizado para determinar la calidad de las lecturas generadas y sus estadísticos. Estas lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia (*Sscrofa10.2*) usando el programa *TopHat v2.0.1* (Trapnell et al., 2009) y anotadas con la herramienta *intersectBED* de *BEDtools* (Quinlan et al., 2010). Finalmente, los transcritos fueron ensamblados con el programa *Cufflinks v2.0.2* (Trapnell et al., 2012).

Análisis de la expresión génica: Se determinó la correlación entre el total de lecturas mapeadas para cada gen, obtenidas con el programa *QualiMap v0.5* (García-Alcalde et al., 2012), y los datos de expresión en grasa dorsal procedentes de un *Gene-Chip® Porcine microarray* de *Affymetrix*. Los paquetes de *R DESeq* (Anders et al., 2010) y *EdgR* (Robinson et al., 2010) fueron utilizados para determinar qué genes estaban diferencialmente expresados (DE) entre los dos grupos. Los genes DE fueron analizados con la herramienta *ClueGO* del programa *Cytoscape* (Bindea et al., 2009), con el objetivo de identificar las rutas metabólicas sobrerrepresentadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la secuenciación del transcriptoma del tejido adiposo se generaron un total de 462M lecturas pareadas de 75 pb, de las cuales alrededor del 85% fueron mapeadas sobre la secuencia de referencia del genoma porcino (*Sscrofa10.2*). Las lecturas mapearon mayoritariamente en exones tanto antes (66-72%) como después de ensamblarlas en transcritos (42-55%). Analizando las lecturas mapeadas en cada gen, se observó un total de 15.687 genes. Su expresión en tejido adiposo estaba altamente correlacionada entre los grupos H y L ($r=0.98$). Además, los valores de expresión de RNA-Seq fueron comparados con los obtenidos con *microarrays*, observándose una correlación de *Spearman* de $r=0.68$, en concordancia con trabajos previos (Esteve-Codina et al., 2011; Chen et al., 2011; Ramayo-Caldas et al., 2012a). Para el análisis de expresión comparativa, se eliminaron los genes cuya media de lecturas mapeadas era inferior a 20 (12.731 genes), de los cuales 529 se detectaron como diferencialmente expresados con el paquete *EdgeR* y 426 con el *DESeq* (*fold change* $\geq 1,2$, *p-value* $\leq 0,01$ y *FDR* $\leq 0,1$). Combinando los resultados de los dos programas observamos un solapamiento de 372 genes (Figura 1), de los cuales 291 están sobreexpresados en el grupo L mientras que 81 se encuentran subexpresados en este mismo grupo. Un total de 42 de los genes diferencialmente expresados habían sido identificados previamente en un GWAS para el perfil de ácidos grasos en músculo (Ramayo-Caldas et al., 2012b). Entre las rutas metabólicas sobrerrepresentadas cabe destacar las de señalización del calcio, insulina y adipocitoquinas, así como la ruta de síntesis de ácidos grasos (Tabla 1). Estas rutas de señalización regulan una gran variedad de vías metabólicas y confirman la importancia del tejido adiposo como regulador de la homeostasis energética, más allá de un simple almacén de energía. Además, la sobrerrepresentación de la síntesis de lípidos confirma la implicación de este órgano en la composición de ácidos grasos en músculo y consecuentemente en la determinación de la calidad de la carne en cerdos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S. & Huber, W. 2010. *Genome Bio.* 11(10):R106.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H. et al. 2009. *Bioinformatics* 25(8):1091-3.
- Chen, C., Ai, H., Ren, J. et al. 2011. *BMC Genomics* 12(1):448.
- Esteve-Codina, A., Kofler, R., Palmieri, N. et al. 2011. *BMC Genomics* 12(1):552.
- García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J.

et al. 2012. *Bioinformatics* 28(20):2678-2679. • Jung, W.Y., Kwon, S.G., Son, M. et al. 2012. *PloS ONE* 7(9):e42198. • O’Hea, E.K. & Leveille G.A. 1969. *The Journal of Nutrition* 99(3):338-344. • Quinlan, A.R. & Hall, I.M. 2010. *Bioinformatics* 26(6):841-842. • Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Esteve-Codina, A. et al. 2012. *BMC Genomics* 13(1):547. • Ramayo-Caldas, Y., Mercadé, A., Castelló, A. 2012. *J Anim Sci* 90(9):2883-93. • Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. 2010. *Bioinformatics* 26(1):139-140. • Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L. 2009. *Bioinformatics* 25(9):1105-1111. • Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., et al. 2012. *Nature protocols* 7(3):562-578.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-29821-C02 (*Ministerio de Economía y Competitividad*) y por el Programa de Innovación Consolider-Ingenio 2010 (CSD2007-00036). J. Corominas ha sido financiado con la beca FPI del *Ministerio de Educación* (BES-2009-018223), Y. Ramayo con una beca FPU (AP2008-01450) y A. Puig-Oliveras con una beca PIF (458-01-1/2011).

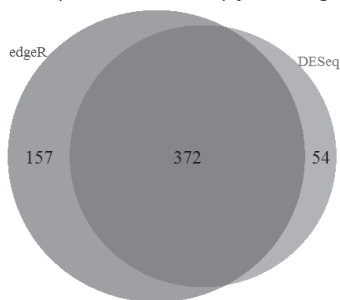


Figura 1 Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados, usando los paquetes de R: *DESeq* y *EdgeR*.

Tabla 1: Rutas metabólicas sobrerrepresentadas en los genes diferencialmente expresados entre grupos (L y H).

Ruta	Genes	p-value
Contracción músculo cardíaco	13	3.95E-07
Cardiomiopatía hipertrófica	12	4.58E-06
Ruta señalización del calcio	15	1.12E-04
Secreción biliar	9	2.02E-04
Glicolisis / Gluconeogénesis	6	1.97E-02
Síntesis de ácidos grasos	2	3.03E-02
Ruta señalización de la insulina	8	3.93E-02
Ruta señalización de adipocitoquinas	5	4.43E-02

DIFFERENTIAL TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN ADIPOSE TISSUE OF PIGS PHENOTYPICALLY EXTREME FOR INTRAMUSCULAR FATTY ACID COMPOSITION

ABSTRACT: The adipose tissue is one of the main organs implicated in the regulation of porcine lipid metabolism and it is involved in the overall fatty acid synthesis. New advances in high-throughput technologies allowed us to characterize the porcine adipose tissue transcriptome architecture. The main goal of this work was to detect the over-represented pathways in 12 Iberian x Landrace crossbred pigs showing extreme phenotypes for intramuscular fatty acid composition (L and H). Data obtained represents 11.5-fold of the porcine genome and most of the reads were mapped in coding regions (66-72%). The RNA-Seq expression data shows a high correlation with microarrays data ($r=0.68$). A differential expression analysis identified 372 differential-expressed genes between both groups. In the L group, 291 genes were detected as up-regulated genes, while only 81 genes were down-regulated. Differential-expressed genes allowed us to identify over-represented pathways such as fatty acid biosynthesis, insulin and adipocytokine signaling pathways. These results will be analyzed to find candidate genes and networks regulating meat quality traits in pigs.

Keywords: RNA-Seq, transcriptome, adipose tissue, pork.

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS EXPRESADAS MEDIANTE RNA-Seq EN CERDOS CON FENOTIPOS DIVERGENTES PARA CRECIMIENTO Y ENGRASAMIENTO

Martínez A.M.¹, Pérez-Montarelo D., Rodríguez C., Ibañez N.², Folch J.M.³, Silió L., Alves E., Fernández A.I.

¹Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, Madrid,

²IRTA, Genètica i Millora Animal, Lleida

³Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB.

Dpto. de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, UAB

E-mail: martinez.angel@inia.es

INTRODUCCIÓN

Estudios previos llevados a cabo en un cruce experimental de cerdo Ibérico x Landrace han mostrado la existencia de regiones del genoma altamente asociadas con caracteres productivos (Varona et al., 2002; Óvilo et al., 2002; Fernández et al., 2012). A pesar de que se han identificado polimorfismos en genes candidato asociados a estos caracteres, no se han encontrado evidencias concluyentes de su causalidad (Óvilo et al., 2002). Las recientes tecnologías de secuenciación masiva permiten análisis más potentes en la ruta del QTL a la mutación causal. Una de estas tecnologías es el RNA-seq, que permite estudiar el transcriptoma (Wang et al., 2009), de manera más eficiente (Marioni et al., 2008). Esta técnica no se restringe a la búsqueda de genes transcritos y estudios del nivel de expresión, sino que al tratarse de un sistema de secuenciación permite analizar variaciones en la secuencia transcrita. Estudios previos han confirmado su utilidad como potente herramienta para la identificación y análisis de polimorfismos presentes en genes expresados (Salem et al., 2012; Cánovas et al., 2010). Presenta asimismo diversas ventajas frente a las plataformas de microarrays tanto para análisis de expresión diferencial como para la determinación de genotipos.

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de variantes génicas de un solo nucleótido (SNVs) informativas en animales divergentes para crecimiento magro, con el propósito final de identificar potenciales mutaciones con efecto sobre estos caracteres. Para ello se ha llevado a cabo un análisis de RNA-Seq sobre muestras de hipotálamo como la glándula reguladora del crecimiento, consumo de energía y acumulación de grasa, y de hígado como el principal órgano de control del metabolismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y datos fenotípicos. La selección de los individuos se realizó mediante un análisis de componentes principales a partir de los datos fenotípicos de 144 individuos procedentes de un retrocruce Ibérico x Landrace (F1 x Landrace), utilizando cuatro caracteres indicadores de crecimiento y composición corporal. Cuatro machos de cada extremo (grupos A y B), fueron seleccionados para el análisis posterior. Los valores medios de los caracteres incluidos en el análisis para los individuos seleccionados en los grupos A y B fueron: ganancia media diaria 0,78 - 0,92 kg/d, espesor de tocino dorsal 11,6 - 16,2 mm y porcentajes de C18:2 en grasa dorsal 16,7 - 12,6 e intramuscular 11,9 - 8,1.

Obtención de ARN, secuenciación. El ARN de los ocho individuos seleccionados fue aislado a partir de muestras de hígado e hipotálamo utilizando el kit *Ribopure™ of High Quality Total RNA* (Ambion), cuantificado y sometido a control de calidad usando el Bioanizador Agilent 2100. La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del CNAG, usando un equipo *Hi-Seq 2000* (Illumina), en pools de 3 muestras y lecturas de 2x75pb, con más de 60 M de lecturas por pool.

Mapeo y detección de SNVs. Las secuencias obtenidas fueron mapeadas frente al genoma de referencia de cerdo *Sscrofa10.2* usando el programa *CLC Genomics Workbench*. El mapeo se realizó individualmente por cada una de las muestras usando los parámetros por defecto del programa, permitiendo un máximo de dos inconsistencias. Para la detección de SNVs se utilizó la herramienta *Quality-based Variant Detection* del programa con los parámetros por defecto: calidad mínima central 20 y calidad de la región circundante (5pb) 15, una profundidad mínima de lectura de 10x y una frecuencia mínima de variación al 20%. La distribución de los SNVs identificados por cromosoma se llevó a cabo calculando el porcentaje de SNVs presente en cada cromosoma respecto al número total y se compararon con el porcentaje esperado de variaciones en cada cromosoma a partir de la

información incluida en la base de datos *Ensembl Variation 70*. La anotación funcional y enriquecimiento de términos biológicos de los genes portadores de los SNVs identificados se llevó a cabo utilizando la herramienta FatiGo de Babelomics.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 839 M y 877 M de lecturas pareadas de 75 pb para hipotálamo e hígado, respectivamente. Entre un 66 y un 77% de las lecturas fueron mapeados en el genoma de referencia, de las cuales alrededor del 50% mapeaban sobre genes anotados. Los resultados de la identificación de SNPs respecto a la secuencia de referencia se resumen en la Tabla 1. El número total de SNVs detectados frente a la secuencia de referencia fue similar en hígado e hipotálamo, con más de 125.000 anotados en aproximadamente 10.000 genes. Entre ellos se identificaron un 66% de SNPs, tanto en hígado como en hipotálamo, anotados en más de 7.000 genes diferentes que aparecieron segregando (detección de ambos alelos) en los individuos analizados (Tabla 1). De este modo se identificaron SNVs polimórficos y por lo tanto SNPs reales no atribuibles a errores de anotación en la secuencia de referencia. De éstos, más de 6.000 y de 4.900 fueron no sinónimos en hipotálamo e hígado, respectivamente. Como es de esperar el número de SNPs sinónimos fue superior al de no sinónimos (tasa no sinónimo/ sinónimo = 0,45). Adicionalmente, se identificaron los SNPs informativos en los animales analizados, estableciendo como criterio la detección de al menos dos genotipos a frecuencias distintas entre ambos grupos (Tabla 1). Un 7% del total de SNPs identificados correspondieron a esta clase. En el perfil de la distribución de estos últimos SNPs destacan los cromosomas 1, 7, 10, 11 y 14, donde la proporción de variantes identificadas se mostró por encima o debajo de la esperada en hipotálamo, hígado o en ambos tejidos (Figura 1). Por otro lado, la anotación funcional de los genes portadores de estos SNPs reveló el enriquecimiento de los términos Gene Ontology (p -corregida $<0,05$) relacionados con la unión de factores de crecimiento, la regulación de procesos metabólicos y el metabolismo de aminoácidos y de lípidos. Además se encontró enriquecimiento en la ruta KEGG (p -corregida $<0,05$) para el metabolismo de lípidos, tanto en hígado como hipotálamo. Resultados concordantes con los genes que participan de los principales procesos biológicos atribuidos a ambos tejidos.

Finalmente se llevó a cabo un examen más detallado centrado en aquellos SNPs identificados en regiones cromosómicas particularmente relevantes por ser portadoras de QTL con efectos importantes sobre caracteres de crecimiento y engrasamiento (Varona et al., 2002; Fernández et al., 2012). Estas regiones corresponden a los cromosomas SSC2: 148-152 Mb, SSC4: 68-85 Mb, SSC4: 127-132 Mb y SSC6: 134-145Mb. Del total de SNPs identificados, 176 SNPs informativos (43 genes) y 136 SNPs informativos (31 genes) detectados en hipotálamo e hígado respectivamente se localizan en estas regiones. Entre éstos destacan interesantes genes candidatos funcionales como *FGF1* (17 SNPs) para el QTL del SSC2, *VCAM1* (1 SNP) y *AGL* (3 SNPs) para los QTL del SSC4 y *JAK1* (3 SNPs) para el QTL del SSC6.

Como en la mayoría de los estudios que emplean tecnologías de secuenciación masiva, en este estudio se ha obtenido gran cantidad de datos que, tras una etapa de validación, permitirán llevar a cabo nuevos estudios de asociación con el fin de identificar los genes y las mutaciones causales de la variación fenotípica estudiada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Varona, L., Ovilo, C., Clop, A. et al., 2002 *Genome Res* 80,145-154
- Óvilo, C., Clop, A., Noguera, J.L. et al., 2002 *J Anim Sci* 80,2801-2808
- Fernández, A.I., Pérez-Montarelo, D., Barragán, C. et al., 2012 *BMC Genetics* 13, 41
- Óvilo, C., Oliver, A., Noguera, J.L. et al., 2002 *Genet Sel Evol* 34, 465-479
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. 2009. *Nat Rev Genet* 10,57-63
- Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., et al., 2008 *Genome Res* 18,1509-1517
- Salem, M., Vallejo, R.L., Leeds, T.D. et al., 2012 *PlosOne* 7,e36264
- Cánovas, A., Rincon, G., Islas-Trejo, A. et al., 2010 *Mamm Genome* 21,592-598.

Agradecimientos: Este estudio se ha realizado bajo el marco del proyecto AGL2011-29821-C02. Martínez A.M. y Pérez-Montarelo D. disfrutaron de becas FPI (BES-2012-056563 y BES-2009-025417).

Tabla 1. Resumen de los SNVs identificados por tejido: total de SNVs identificados respecto de la secuencia de referencia, SNVs segregando en los animales analizados y SNVs informativos entre los grupos A y B de divergente crecimiento y composición corporal

	SNVs	Genes	Región codificante	No sinónimo
Hipotálamo				
Total	125.488	11.328	84.941	9.588
Segregando *	83.640	9.647	51.765	6.088
Informativos**	10.064	3.133	1.632	306
Hígado				
Total	125.163	9.200	93.559	7.707
Segregando*	85.491	7.794	61.127	4.975
Informativos**	8.962	2.118	1.515	192

* SNVs polimórficos= SNPs

** SNPs donde se detectan al menos dos genotipos a frecuencias distintas entre ambos grupos

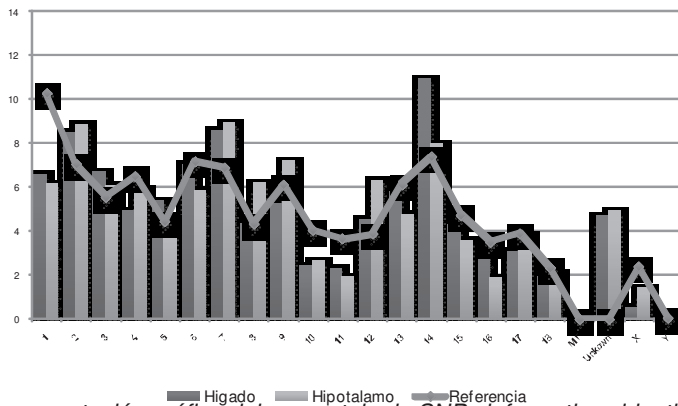


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de SNPs informativos identificados por cromosoma en hígado e hipotálamo.

IDENTIFICATION OF EXPRESSED GENE VARIANTS BY RNA-Seq IN PIGS PHENOTIPICALLY DIVERGENT FOR GROWTH AND FATNESS

ABSTRACT: The RNA-Seq technique is not only a great tool for transcriptome characterization and gene expression analyses, but also a powerful tool for analyzing genome variations such as SNVs. In this study we have identified SNPs using RNA-Seq data from liver and hypothalamus samples of two groups of pigs showing divergent phenotypes for growth and fatness coming from an Iberian x Landrace backcross. We have identified more than 83,000 SNPs segregating in these animals. Among them, 10,064 and 8,962 SNPs in hypothalamus and liver, respectively, are potentially informative for further analyses. The distribution of the SNPs along pig chromosomes revealed some interesting data, such as for chromosomes 1, 7, 10, 11 and 14 where the number of informative SNPs differed from the expected. Among the genes carrying the detected informative SNPs highlight *FGF1*, *VCAM1*, *AGL* and *JAK1* as powerful biological and positional candidate genes to underlay the QTL for growth and fatness identified in previous studies.

Keywords: RNA-Seq, SNV identification, Growth, Fatness

ESTUDIOS DE CO-ASOCIACIÓN GENÓMICA Y REDES GÉNICAS APLICADOS A LA DISECCIÓN GENÉTICA DEL CONTENIDO INTRAMUSCULAR DE ÁCIDOS GRASOS

Ramayo-Caldas, Y.^{1,2}, Reverter, A.³, Ballester, M.¹, Fortes, M.R.S.⁴, Esteve-Codina, A.¹, Noguera, J.L.⁵, Fernández, A.I.⁶, Folch, J.M.^{1,2}

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra, 08193. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ³Commonwealth Science and Industrial Research Organisation, division of Animal, Food and Health Sciences, Brisbane, Qld 4067, Australia. ⁴The University of Queensland, Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, Center for Animal Science, Gatton, Qld 4343, Australia. ⁵Genètica i Millora Animal, IRTA, Av. Rovira Roure 191, 25198 Lleida, ⁶Departamento Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. Coruña Km7.5, 28040 Madrid. E-mail: yulixaxis.ramayo@uab.es

INTRODUCCIÓN

El cerdo (*Sus scrofa domestica*) constituye una de las principales fuentes de carne para la humanidad, y es también un excelente modelo animal para el estudio de enfermedades metabólicas en humanos como la obesidad, la diabetes tipo 2 y la arteriosclerosis (Bendixen et al., 2010). Los ácidos grasos (AG) juegan un papel importante actuando como moléculas de señalización celular en diversas rutas metabólicas asociadas a este tipo de patologías (Wakil and Abu-Elheiga 2009), y además en la determinación de la calidad organoléptica y nutricional de la carne porcina (Wood et al., 2008). Como consecuencia, descifrar la base molecular del metabolismo de los AG podría contribuir al conocimiento de la base genética de las enfermedades metabólicas, además de favorecer el desarrollo tecnológico para mejorar la calidad de la carne porcina. El metabolismo de los AG es un proceso complejo determinado por factores ambientales e interacciones entre muchos *loci*. Por lo tanto, estudiar la base genética del metabolismo de los AG, en el contexto de las interacciones génicas y propiedades topológicas de las redes biológicas que los determinan, parece una alternativa interesante a los clásicos métodos reduccionistas empleados hasta la actualidad, como por ejemplo el análisis de ligamiento y/o de asociación (GWAS).

El objetivo fundamental de este trabajo fue estudiar la co-asociación entre genes y/o SNPs a lo largo de varios fenotipos e identificar redes génicas, rutas metabólicas y los factores de transcripción (TF) más relevantes de los fenotipos considerados mediante un enfoque holístico denominado *Association Weight Matrix* (AWM) (Fortes et al., 2010) basado en la biología de sistemas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal, fenotipos y genotipos. Se analizaron un total de 144 animales procedentes de un retrocruce experimental (BC1_LD) entre Ibérico (25%) y Landrace (75%). A partir de un estudio previo de componentes principales (Ramayo-Caldas et al., 2012) se seleccionaron los 15 fenotipos más informativos de esta población relacionados con el contenido e índices de AG en el músculo *Longissimus dorsi*. Todos los animales (incluidos los fundadores del cruce) fueron genotipados con el *Porcine SNP60K BeadChip* (Illumina). Después del control de calidad se obtuvieron un total de 48.119 SNPs informativos con una tasa de genotipado superior al 99%. Las coordenadas genómicas de los SNPs corresponden a la última versión de la secuencia del genoma porcino (*Sscrofa10.2*).

Análisis bioinformático

La construcción del AWM comienza con la selección de SNPs a partir de un GWAS. Los elementos de la matriz AWM $\{i, j\}$ corresponden al efecto aditivo normalizado del SNP en la fila i en el fenotipo de la columna j (Fortes et al., 2010). El GWAS se realizó con el programa *QxpaK5* (Perez-Enciso and Misztal 2011) bajo un modelo mixto considerando efectos genéticos aditivos. Para la construcción del AWM se desarrolló un programa en el entorno de programación R siguiendo el procedimiento descrito por Fortes, et. al (2010), pero con algunas modificaciones. De forma concreta, en lugar de seleccionar arbitrariamente el umbral $P < 0,05$ para la selección inicial de los SNPs, este fue elegido en base a la sensibilidad de los datos al comparar diferentes umbrales de distribución ($P=1$ hasta $P= 10^{-5}$) de los TF de mayor relevancia biológica en el metabolismo de los AG *versus* el resto de TF. Por tanto, se seleccionó el umbral $P < 0,035$ que maximizó la diferencia entre ambos grupos de TF. Posteriormente, todos los SNPs asociados con el ácido palmítico (seleccionado como fenotipo principal) y/o con tres o más caracteres fenotípicos ($P < 0,035$),

y que además mapean a menos de 2,5 Kb o más de 850 Kb de un gen, fueron finalmente incluidos en la matriz AWM (total 1.096). El programa *PermutMatrix* (Caraux and Pinloche 2005) fue empleado para visualizar los *clusters* fenotípicos (AWM columnas) y génicos (AWM filas) obtenidos. Con el objetivo de identificar y describir interacciones significativas (gen-gen y/o SNP-gen) se utilizó el algoritmo *PCIT* (Reverter and Chan 2008). La red génica resultante fue visualizada con el programa *Cytoscape* (Shannon et al., 2003). La identificación de Ontologías Génicas (GO) enriquecidas se realizó con la herramienta *BiNGO* (Maere et al., 2005). Mientras que las rutas metabólicas sobre representadas fueron identificadas utilizando el programa *ClueGO* (Bindea et al., 2009). Finalmente, con el objetivo de identificar los 3 TF más relevantes, la red fue explorada hasta identificar dentro de todas las posibles combinaciones el trío de TF co-asociados con el mayor número de genes y con un menor solapamiento entre ellos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra en forma de dendograma jerárquico la distribución de los *clusters* fenotípicos obtenidos a partir de las estimas normalizadas del efecto aditivo. En el gráfico, la proximidad entre los ejes factoriales representa correlaciones fuertes y positivas, mientras que las distancias grandes representan correlaciones negativas. De acuerdo a sus relaciones fisiológicas se observa proximidad entre el ácido palmítico (C16:0) y la suma de AG saturados (SFA), el ácido oleico (C18:1 n-9) y la suma de AG mono-insaturados (MUFA), y el ácido linoleico (C18:2 n-6) y la suma de AG poli-insaturados. En sentido general se observa una estructura similar a la obtenida mediante las estimas de las correlaciones fenotípicas y genéticas, confirmando, como había sido descrito previamente (Fortes et al., 2010), que el AWM puede ser utilizado en la estimación de las correlaciones genéticas.

La red génica obtenida está compuesta por 1.096 nodos y 111.198 ejes. En la misma, cada nodo representa un gen/SNP, mientras que los ejes que los unen representan interacciones significativas entre ellos. El análisis de GO muestra un enriquecimiento de procesos biológicos relacionados entre otros con: *Estructura Anatómica y Morfogénesis, Metabolismo Lipídico, Actividad de Quinasas y Enzimas Reguladoras* (FDR < 0,05). Además, se observa una sobrerepresentación de rutas metabólicas como la del *Factor Inducible por la Hipoxia-1* y *Diabetes Mellitus Tipo 2*. La figura 2A muestra la topología de la red génica una vez identificado el trío de TF co-asociados con el mayor número de genes, los cuales fueron: *Nuclear receptor coactivator 2 (NCOA2, alias TIF2), E1A binding protein p300 (EP300, alias p300) and four and a half LIM domains 2 (FHL2, alias SLIM-3)*. Cabe destacar que los 3 TF tienen en su región promotora sitios de unión para algunos de los TF más relevantes en la regulación del metabolismo de los lípidos y los carbohidratos como son: *SREBP-1, PPARG, PPAR- α , HNF1A, HNF4- α , ER- α y GR- α* . Además, según la base de datos de interacciones entre proteínas *STRING* (<http://string-db.org/>), existen datos experimentales que confirman la interacción proteína-proteína entre los 3 TF identificados en este estudio y algunos de los TF previamente mencionados (Figura 2B). En la red se observa un total de 730 genes predichos como genes diana de los 3 TF (Figura 2A). En dos meta-análisis realizados en humanos (Teslovich et al., 2010; Asselbergs et al., 2012) se ha descrito la relevancia biológica de 39 de estos genes en el control genético de la composición de lípidos plasmáticos. Esta observación constituye una evidencia adicional de la utilidad del cerdo como biomodelo para el estudio de enfermedades metabólicas humanas. Sin embargo, muchos de estos genes nunca hubieran sido considerados bajo un enfoque reduccionista debido a la falta de significación a nivel genómico (por ejemplo, FDR > 0,05). Los resultados obtenidos muestran la utilidad de los enfoques holísticos en el estudio de caracteres complejos y la capacidad del AWM para la identificación de módulos génicos que de forma independiente no serían considerados, a pesar de tener un papel biológico importante en la determinación de los caracteres estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asselbergs et al. 2012. *The American Journal of Human Genetics* **91**(5): 823-838.
- Bendixen et al. 2010. *Brief Funct Genomics* **9**(3): 208-19.
- Bindea et al. 2009. *Bioinformatics* **25**(8): 1091-1093.
- Caraux et al. 2005. *Bioinformatics* **21**(7): 1280-1.
- Fortes et al. 2010. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(31): 13642-7.
- Maere et al. 2005. *Bioinformatics* **21**(16): 3448-

9. ● Pérez-Enciso et al.2011.BMC Bioinformatics **12**: 202. ● Ramayo-Caldas et al.2012. BMC Genomics **13**: 547. ●Reverter and Chan 2008. Bioinformatics **24**(21): 2491-7. ● Shannon et al. 2003. Genome Res **13**(11): 2498-504. ● Teslovich et al.2010. Nature **466**(7307): 707-713. ● Wakil et al.2009. Journal of Lipid Research **50**(Supplement): S138-S143. ● Wood et al.2008. Meat Sci **78**(4): 343-58

Figura 1. Dendrograma jerárquico que muestra la distribución de los *clusters* fenotipicos obtenidos a partir de las estimas normalizadas del efecto aditivo.

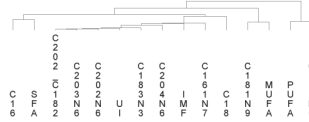
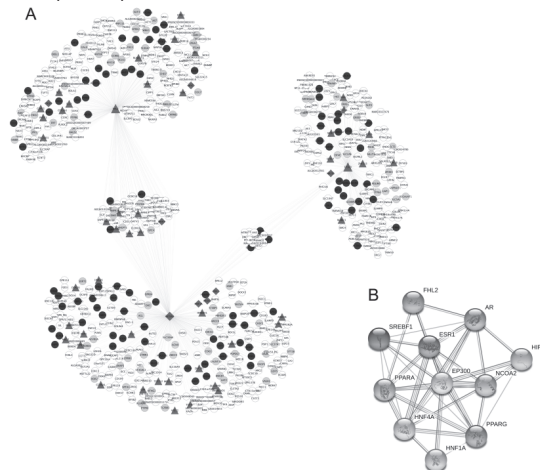


Figura 2. (A) Topología de la red génica una vez identificado el trío de TF. El color de los nodos representa la función biológica de los genes: metabolismo lipídico (azul), metabolismo de carbohidratos (verde), morfogénesis (naranja), TF (rojo). **(B)** Evidencias extraídas de *STRING* de interacciones proteicas entre el trío de TF y otros TF relevantes en la regulación del metabolismo de lípidos y/o carbohidratos. El color de los ejes corresponde al tipo de evidencia que soporta la interacción entre los genes: experimentos funcionales (morado), evidencias bibliográficas (verde).



Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-29821-C02 (Ministerio de Economía y Competitividad) y por el Programa de Innovación Consolider-Ingenio 2010 (CSD2007-00036). Yulixis Ramayo Caldas es becario del programa de Formación de Personal Universitario (AP2008-01450).

CO-ASSOCIATION AND GENE NETWORK ANALYSIS FOR PIG INTRAMUSCULAR FATTY ACID COMPOSITION

ABSTRACT: Pig (*Sus scrofa*) is both a source of food and an animal model for the study of metabolic diseases. Fatty acids play a role in pathways of metabolic diseases and its composition influences pork meat quality. In this study, GWAS results were used in an *Association Weight Matrix* (AWM) approach to predict gene networks for intramuscular fatty acid composition in pigs. Three key transcription factors were identified, which are network hubs: *NCOA2*, *EP300*, *FHL2*. An overrepresentation for GO and pathways related to lipid metabolism was observed. The relevance of 39 of the AWM-predicted target genes controlling plasma lipids in human is already well documented. Our results suggest a cooperative role for the three key TF in the transcriptional regulation of intramuscular fatty acid composition and the control of energy homeostasis in pigs. In addition, we provide further evidences that support the usefulness of pig as an animal model for the study of metabolic diseases in humans.

Keywords: Gene Networks, pig, fatty acids, transcription factors

INTERACCIÓN GENOTIPO X SISTEMA DE PRODUCCIÓN PARA CALIDAD DE CANAL Y CARNE EN CERDOS IBERICOS DE MONTANERA Y CEBO DE CAMPO

García Casco¹, J.M.; Muñoz¹, M.; Rodríguez², M.C. y Silió², L.

¹Centro de I+D en Cerdo Ibérico-INIA, Ctra. Ex-101, km 4,7 (06300 Zafra). ²Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid
Email: garcía.juan@inia.es

INTRODUCCIÓN

El programa oficial de selección del cerdo ibérico incluye un índice en el que se ponderan por su precio de lonja los valores mejorantes de los porcentajes sobre la canal de jamones, paletas y lomos (AECERIBER, 1998). Desde hace varios años la evaluación genética se ha extendido al porcentaje de grasa intramuscular medido en el lomo. Inicialmente todos los cerdos controlados eran cebados en el sistema de *montanera*, basado en los recursos de la dehesa (bellota y hierba). A partir de 2003 se incluyeron también paridas de cerdos engordados al aire libre en el sistema denominado *cebo de campo*, con alimentación basada en cereales y leguminosas y una superficie mínima por cabeza de 100 m².

En este trabajo se propone la incorporación al objetivo de selección del porcentaje de grasa intramuscular mediante el método de intervalos óptimos (Hovenier et al., 1993) y se analiza un índice de selección en el que se consideran distintos los caracteres registrados en cada uno de estos sistemas extensivos para evaluar la posible interacción genotipo x sistema.

MATERIAL Y MÉTODOS

La estimación de parámetros genéticos y ambientales se llevó a cabo a partir de dos bases de datos, facilitadas por AECERIBER, con registros de 4.348 cerdos de *montanera* nacidos en 32 explotaciones de 334 verracos y 1.857 cerdas, y registros de 1.818 cerdos de *cebo de campo* de 22 explotaciones, procedentes de 180 verracos y 836 cerdas. Además de la edad y el peso de sacrificio, y los pesos de canal, de jamones, paletas y lomos perfilados, se midió mediante NIR el porcentaje de grasa intramuscular (GIM) en una muestra tomada del extremo apical del lomo. La Tabla 1 contiene el número de observaciones, las medias y los coeficientes de variación de los caracteres registrados en los dos sistemas. Estos datos se analizaron mediante un modelo animal multivariante para ocho caracteres (JAM, PAL, LOM y GIM en *cebo de campo* y en *montanera*) que incluía la serie de sacrificio (91 niveles) y la estirpe (4 niveles) como efectos fijos.

Tabla 1. Número de observaciones, medias y coeficientes de variación de los caracteres registrados en cerdos de *montanera* y de *cebo de campo*

Carácter	<i>Montanera</i>			<i>Cebo de Campo</i>		
	N	Media	CV	N	Media	CV
Peso de sacrificio, kg	4.348	160,9	10,1	1.818	165,1	8,7
Edad de sacrificio, meses	4.348	16,3	7,0	1.818	17,0	19,5
Peso de canal, kg	4.348	128,5	11,2	1.818	130,5	9,9
Jamones, %	4.336	16,12	7,9	1.736	17,28	8,1
Paletas, %	4.228	10,92	8,1	1.737	11,20	8,8
Lomos, %	3.951	2,33	15,8	1.757	2,96	12,4
GIM, %	3.213	9,57	33,3	1.518	9,44	32,1

A partir de los valores mejorantes estimados se construyó un índice de selección que pondera los caracteres de composición de la canal por sus pesos económicos obtenidos según la teoría clásica (Smith et al., 1986) de cálculo de las derivadas parciales de cada carácter en la ecuación de beneficios. El peso económico del porcentaje de grasa

intramuscular se obtuvo mediante el método propuesto para caracteres con intervalo óptimo (Hovenier et al., 1993). Se consideró una media del intervalo óptimo ($\mu_0 = 9,4\%$) cercana a la media poblacional ($\mu_p = 9,57$ en *montanera* y $\mu_p = 9,44$ en *cebo de campo*, Tabla 1), con un intervalo óptimo de $\mu_0 \pm 5.26$ (*montanera*) y $\mu_0 \pm 4.98$ (*cebo de campo*).

Se calcularon las correlaciones de Pearson entre los valores mejorantes y los índices obtenidos en los dos sistemas para 20 verracos con hijos en las dos bases de datos, y los valores de la correlación de rangos de Kendall, con el fin de comparar las evaluaciones genéticas de estos 20 verracos en cada uno de los sistemas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estimas de heredabilidad y correlaciones genéticas se muestran en la Tabla 2. Las heredabilidades en el sistema de *cebo de campo* (0,43 - 0,66) son claramente superiores a las estimas en *montanera* (0,24 - 0,33) debido a la mayor variabilidad ambiental (clima, orografía, disponibilidad de alimento) en este sistema. Las correlaciones genéticas entre los caracteres registrados en cada sistema indican una moderada interacción genotipo x sistema de producción, excepto para el porcentaje de lomos. Las correlaciones estimadas entre los porcentajes de piezas nobles y el de la grasa intramuscular corroboran, con la excepción de paletas en *montanera*, el posible efecto negativo sobre la calidad de carne de la selección orientada exclusivamente a la mejora del rendimiento cárnico (Fernández et al., 2003).

Tabla 2. Estimaciones de heredabilidades (diagonal) y correlaciones genéticas (encima de la diagonal) de los caracteres incluidos en el índice de selección y errores típicos (entre paréntesis)

		JAM		PAL		LOM		GIM	
		Mont.	Campo	Mont.	Campo	Mont.	Campo	Mont.	Campo
JAM	Mont.	0,24 (0,03)	0,64 (0,16)	0,63 (0,06)	0,46 (0,14)	0,59 (0,06)	0,67 (0,12)	-0,26 (0,08)	-0,52 (0,14)
	Campo		0,43 (0,04)	0,37 (0,17)	0,70 (0,04)	0,29 (0,15)	0,50 (0,05)	-0,19 (0,15)	-0,26 (0,08)
PAL	Mont.			0,31 (0,03)	0,67 (0,13)	0,34 (0,08)	0,22 (0,14)	0,10 (0,09)	-0,42 (0,14)
	Campo				0,45 (0,05)	0,09 (0,12)	0,24 (0,08)	-0,01 (0,14)	-0,23 (0,09)
LOM	Mont.					0,33 (0,04)	0,90 (0,08)	-0,22 (0,10)	-0,43 (0,14)
	Campo						0,44 (0,05)	-0,14 (0,14)	-0,27 (0,09)
GIM	Mont.							0,31 (0,04)	0,76 (0,11)
	Campo								0,66 (0,05)

Las correlaciones de Pearson, para los valores mejorantes y el índice, y de Kendall, para las ordenaciones por mérito genético, en los 20 verracos, se presentan en la Tabla 3. Todas las correlaciones son positivas y significativamente distintas de cero con valores situados entre 0,50 y 0,88.

Las estimas de heredabilidades y correlaciones ofrecen buenas perspectivas a la selección en ambos sistemas, especialmente en el *cebo de campo*. Aunque la interacción observada genotipo x sistema es menor que la descrita para sistemas orgánico y convencional de producción porcina (Wallenbeck et al., 2009), parece aconsejable, siempre que sea posible, la implementación de índices de selección que combinen registros obtenidos en ambos sistemas de producción.

Tabla 3. Correlaciones de Pearson (valores mejorantes e índice selección) y de Kendall (rankings) entre los dos sistemas de los 20 verracos con registros en montanera y cebo de campo

	Valores Mejorantes				Índice de Selección
	JAM	PAL	LOM	GIM	
Pearson	0,67*	0,82*	0,88*	0,77*	0,65*
Kendall	0,50*	0,57*	0,71*	0,71*	0,55*

* $P < 0.005$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• AECERIBER. Sólo Cerdo Ibérico, 1:15-20. • Fernández, A., de Pedro, E., Núñez, N.; Silió, L.; García Casco, J.M. & Rodríguez, C. 2003. Meat Science 64: 405-410. • Hovenier, R., Brascamp, E.W., Kanis, E., van der Werf, J.H.J. & Wassenberg, 1993. A.P. J. Anim. Sci. 71, no 6: 1429-1433. • Smith, C., James, J.W. & Brascamp, E.W. 1986. Anim. Prod. 43: 545-551. • Wallenbeck, A., Rydhmer, L. & Lundeheim, N. 2009. Livest. Sci. 123: 154-160.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el proyecto RTA2011-00113-00-00 (cofinanciación FEDER). Los autores agradecen su colaboración a la Asociación de Criadores de Cerdo Ibérico (AECERIBER).

GENOTYPE X PRODUCTION SYSTEM INTERACTION FOR CARCASS AND MEAT QUALITY IN IBERIAN PIGS

ABSTRACT: A selection index for carcass composition and quality traits is suggested for Iberian pigs fattened with two different free-range systems: *montanera* (acorn feeding) and *cebo de campo* (feeding mainly based on cereals and vegetables). Heritabilities and genetic correlations were estimated from two data sets with 4,348 records of *montanera* pigs and 1,818 records of *cebo de campo* pigs, with a multitrait animal model that included carcass composition and quality traits expressed in both systems as different traits. A selection index was built with the estimated breeding values considering carcass composition traits by their economic weight, and they were calculated by means of the partial derivative of the profit function. Otherwise, the economic weight of intramuscular fat was obtained using the theory of optimum traits. The estimates of heritabilities showed higher values in *cebo de campo* system (0.43 - 0.66) than in *montanera* system (0.24 - 0.33) with genetic correlations between same traits recorded in different systems of moderate values (around 80%) and negative correlations between premium cuts and intramuscular fat. Pearson and Kendall ranking correlations of breeding values and selection index were calculated in a subset of 20 sires with offspring in the both system in order to show the interaction between genetic evaluation and production systems.

Keywords: Carcass composition, intramuscular fat, genetic parameters, ranking correlations

MEJORA DEL CONTENIDO DE ÁCIDO OLEICO EN CARNE DE CERDO MEDIANTE SELECCIÓN DIRECTA Y MARCADORES MOLECULARES

Ros-Freixedes, R., Pena, R.N., Tor, M. y Estany¹, J.

Universitat de Lleida, Departament de Producció Animal, Rovira Roure, 191, 25198 Lleida
¹jestany@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La composición de la grasa de los productos cárnicos es uno de los factores que determina su calidad nutricional. El contenido en ácido oleico (C18:1) se ha asociado con beneficios para la salud humana, mientras que la grasa saturada (SFA) se ha relacionado con un aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y metabólicas. El valor nutricional de la grasa en carne se puede mejorar sustituyendo SFA por ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). En un trabajo anterior mostramos que el contenido de C18:1 en grasa intramuscular (GIM) es altamente heredable (Ros-Freixedes et al., 2012a). Una posible estrategia para mejorar la calidad de GIM es, pues, la selección directa por C18:1 a partir de registros fenotípicos de parientes. Se han descrito algunos polimorfismos en la región promotora del gen estearoil-CoA desaturasa (*SCD*) (Ren et al., 2004), que codifica el enzima que regula la desaturación del ácido esteárico (C18:0) a C18:1, que pueden afectar la relación C18:1/C18:0 (Uemoto et al., 2012). Diversos experimentos en la población Duroc descrita a continuación han mostrado que la expresión de *SCD* está relacionada con el contenido (Cánovas et al., 2009) y el grado de desaturación de la grasa (Ros-Freixedes et al., 2012b). En este trabajo se presentan los primeros resultados de (1) la respuesta obtenida en un experimento de selección por C18:1 en GIM, y (2) un estudio de asociación de varios polimorfismos del gen *SCD* con C18:1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento de selección. Los cerdos procedieron de 3 lotes de la población Duroc descrita en Ros-Freixedes et al. (2012a). En cada lote independientemente se escogieron unos 90 cerdos, divididos en dos grupos de 45 según fueran escogidos al azar (control, C) o seleccionados (S) según el valor genético BLUP de la camada para C18:1 en GIM. La predicción del valor genético de C18:1 se basó en un modelo univariado sobre 943 registros de C18:1 obtenidos en muestras de *gluteus medius* de parientes tomadas en la línea de sacrificio. El modelo incluyó el lote como efecto sistemático y se resolvió asumiendo una heredabilidad de 0.41. El experimento contó con un total de 268 animales procedentes de 137 camadas y 28 verracos. El diferencial de selección promedio fue del 0.57%.

Manejo de los animales y obtención de muestras. Los cerdos fueron castrados y criados en condiciones comerciales con alimentación a voluntad y se sacrificaron a los 210 días. Se pesó la canal (PC), se midió el espesor de grasa dorsal (GD) y se estimó su porcentaje de magro (PM). Después de 24 h a 2°C, se les extrajo una muestra de *gluteus medius* (GM) del jamón izquierdo y, a un subconjunto de ellos, otra de *longissimus dorsi* (LD) entre la 3ª y 4ª últimas costillas. En ambos músculos se determinó por duplicado la composición en ácidos grasos (% de los ácidos grasos totales) y contenido de GIM (% de materia seca) mediante determinación cuantitativa por cromatografía de gases (Bosch et al., 2009).

Genotipado. Se extrajo ADN de las muestras de músculo. El genotipado del SNP AY487830:g.2281A>G, localizado en la región promotora del gen *SCD*, se realizó mediante un protocolo de discriminación alélica a partir de 10 ng de ADN genómico, utilizando sondas *TaqMan* alelo-específicas marcadas fluorescentemente. El genotipado se realizó cuantificando la acumulación de fluorescencia en un aparato de PCR a tiempo real 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Se genotiparon también los SNP g.2108C>T y g.2287T>C. Además de los animales del experimento de selección, se genotiparon más cerdos de la misma población con registros de C18:1, ascendiendo a un total de 616 animales procedentes de 7 lotes.

Análisis estadístico. La respuesta a la selección se analizó como la diferencia entre los valores genéticos medios de los cerdos en los grupos S y C con un modelo animal mixto univariado con el lote (1 a 15) como efecto sistemático. Se usaron los 1,205 registros de

C18:1 disponibles y una genealogía de 111,305 animales (años 1990-2012). Se usó el programa TM (Legarra et al., 2008). El efecto del polimorfismo en el conjunto de cerdos genotipados se analizó mediante un modelo que incluyó el lote (1 a 7) y el genotipo (AA, AG y GG). En este caso, también se contrastaron los efectos aditivo y dominante reemplazando los tres genotipos por las covariables a y d, codificadas como 1, 0, -1 y 0, 1, 0 para AA, AG y GG, respectivamente. Las diferencias entre genotipos se contrastaron con un test de Tukey-HSD ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico JMP 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran las características de la distribución marginal posterior de la respuesta a la selección. Se observó una moderada respuesta a la selección en el lote 1, pero inferior a la predicha. En el lote 2 la respuesta fue menor, y en el lote 3, nula. La disminución de la varianza genética en estos lotes y de la precisión de las predicciones utilizadas para asignar los cerdos a cada grupo (las evaluaciones genéticas en el lote 3 se hicieron a partir de datos de parientes sensiblemente más alejados temporal y genéticamente) podrían explicar estos resultados.

Tabla 1. Descripción del contenido de ácido oleico (%) y respuesta a la selección

Lote	n	Media (DT)	Respuesta a la selección		
			Media (DT)	HPD95 ¹	P(>0) ²
Total	268	45.36 (2.01)	+0.22 (0.15)	-0.08; +0.51	0.93
Lote 1	85	45.69 (2.88)	+0.38 (0.25)	-0.09; +0.90	0.94
Lote 2	96	44.67 (1.41)	+0.25 (0.24)	-0.22; +0.70	0.86
Lote 3	87	45.80 (1.19)	+0.03 (0.25)	-0.42; +0.57	0.54

¹Intervalo mínimo de máxima densidad al 95% de probabilidad. ²Probabilidad de que la respuesta sea positiva.

En la Tabla 2 se muestra el efecto del polimorfismo *g.2281A>G* del gen *SCD* sobre los caracteres de composición de la canal y composición de la grasa. El alelo A se asocia favorablemente a un mayor contenido de C18:1 (MUFA) y del índice C18:1/C18:0 (MUFA/SFA) sin afectar a GIM ni PC, GD o PM. El polimorfismo presenta un modo de acción génica aditivo, con un efecto de sustitución para C18:1 entre 0.7 y 0.8%, en GM y LD, respectivamente.

Tabla 2. Efecto del SNP *SCD g.2281A>G* sobre caracteres de canal y composición de la grasa intramuscular (n=616, LD: n=236)

Carácter ¹	Diferencias entre genotipos ²				Efecto aditivo (a) y dominante (d)			
	AA	AG	GG	p-valor	a	p-valor	d	p-valor
PC, kg	93.13	93.83	93.33	0.73	-0.101	0.85	0.596	0.43
GD, mm	22.29	22.48	22.48	0.88	-0.097	0.65	0.093	0.75
PM, %	44.30	43.88	43.95	0.71	0.179	0.53	-0.242	0.54
Músculo GM								
GIM, %MS	15.32	14.95	15.08	0.75	0.122	0.65	-0.247	0.50
C18:1, %	46.77 ^a	45.98 ^b	45.31 ^c	<0.001	0.726	<0.001	-0.060	0.73
MUFA, %	51.59 ^a	50.41 ^b	49.50 ^c	<0.001	1.047	<0.001	-0.137	0.47
C18:1/C18:0	4.85 ^a	4.50 ^b	4.15 ^c	<0.001	0.349	<0.001	0.003	0.95
MUFA/SFA	1.53 ^a	1.46 ^b	1.39 ^c	<0.001	0.071	<0.001	-0.004	0.72
Músculo LD								
GIM, %MS	11.39	11.39	11.13	0.86	0.131	0.69	0.128	0.77
C18:1, %	47.65 ^a	46.59 ^b	46.04 ^b	<0.001	0.806	<0.001	-0.259	0.28
MUFA, %	52.63 ^a	51.30 ^b	50.41 ^c	<0.001	1.108	<0.001	-0.220	0.40
C18:1/C18:0	4.68 ^a	4.23 ^b	3.97 ^c	<0.001	0.355	<0.001	-0.090	0.16
MUFA/SFA	1.50 ^a	1.40 ^b	1.35 ^c	<0.001	0.073	<0.001	-0.022	0.14

¹ Abreviaturas definidas en el texto. ² f(AA)=0.19; f(AG)=0.50; f(GG)=0.31.

^{a-c} Superíndices distintos indican diferencias significativas entre genotipos ($p < 0.05$).

El efecto favorable del alelo A también se dio en músculo semimembranoso y en grasa subcutánea, y fue consistente en todos los lotes. Por otra parte, se ha comprobado que el polimorfismo está presente también en otras poblaciones. Uemoto et al. (2012) encontraron, también en Duroc, que los SNP *g.2108C>T* y *g.2228T>C* del promotor del gen *SCD* estaban asociados a C18:1 en GIM y grasa subcutánea, con un efecto aditivo del haplotipo CT de una magnitud similar a la aquí encontrada. En otros tipos genéticos, aunque se ha observado que este último polimorfismo se asocia con la composición de la grasa, los resultados con respecto a C18:1 no son tan evidentes ni consistentes (Maharani et al., 2013; Renaville et al., 2013). En nuestro caso, el alelo A de *g.2281A>G* forma un haplotipo muy estable con los alelos C y T de *g.2108C>T* y *g.2228T>C*, respectivamente, y alcanza a explicar un 12% de la variancia aditiva de C18:1 en GIM. La frecuencia del alelo A en nuestra población es suficientemente elevada (0.44) como para, si se fija, aumentar un 0.83% el promedio del contenido en C18:1 de la carne de cerdo. La frecuencia de A en el grupo S sólo fue superior a la del grupo C en el lote 1.

Se recomienda no seleccionar por C18:1 sin antes haber implementado un sistema rutinario de registro de C18:1 con el que poder evaluar a los candidatos a la selección con un número suficiente de datos fenotípicos de familiares próximos. En cualquier caso, alternativa o complementariamente a la selección directa, el marcador estudiado se propone como un criterio útil para mejorar C18:1. El que presente un efecto aditivo consistente y relevante, a la vez que segregue a frecuencias intermedias, convierten a este haplotipo en un firme candidato a utilizarse en la selección por C18:1 (MUFA), máxime cuando no parece alterar negativamente ni el contenido de GIM ni los demás caracteres productivos analizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bosch, Tor, Reixach & Estany. 2009. Meat Sci. 82: 432-437. • Cánovas, Estany, Tor, Pena & Doran. 2009. J. Anim. Sci. 87: 3905-3914. • Legarra, Varona & López de Maturana. 2008. Manual TM (<http://cat.toulouse.inra.fr/~alegarra/>). • Maharani, Park, Lee, Yoo, Lim, Han, Lee, Ko, Cho & Lee. 2013. Mol. Biol. Rep. 40: 73-80. • Ren, Knorr, Guo, Ding, Ai, Brenig & Huang. 2004. Anim. Genet. 35: 245-264. • Renaville, Prandi, Fan, Sepulcri, Rothschild & Piasentier. 2013. Meat Sci. 93: 495-500. • Ros-Freixedes, Reixach, Tor & Estany. 2012a. J. Anim. Sci. 90: 4230-4238. • Ros-Freixedes, Pena, Tor & Estany. 2012b. XVI Reunión de Mejora Genética Animal, Ciutadella de Menorca. • Uemoto, Nakano, Kikuchi, Sato, Ishida, Shibata, Kadowaki, Kobayashi & Suzuki. 2012. Anim. Genet. 43: 225-228.

Agradecimientos: Agradecemos a Josep Reixach de Selección Batallé la colaboración en el experimento. Proyecto financiado por el MICINN (AGL2009-09779). R. Ros-Freixedes es beneficiario de una beca FPI (BES-2010-034607).

BREEDING FOR HIGH OLEIC ACID CONTENT IN PORK USING DIRECT SELECTION AND MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT: Nutritional value of pork can be improved by replacing saturated fatty acids (SFA) in intramuscular fat (IMF) with monounsaturated fatty acids (MUFA), particularly oleic acid (C18:1). A one-generation selection experiment for C18:1 in *gluteus medius* based on phenotypic values of relatives was performed. Pigs in the experiment were also genotyped for the AY487830:*g.2281A>G* SNP polymorphism in the promoter region of the *SCD* gene. Results indicate that C18:1 may respond to direct selection if candidates are evaluated accurately. The allele A proved to be consistently associated to enhanced C18:1 and MUFA. The polymorphism did not affect IMF and production traits. It is concluded that, complementarily or alternatively, the *SCD* polymorphism can be used as a molecular marker for C18:1 in selection schemes.

Keywords: desaturation index, oleic acid, selection, stearoyl-CoA desaturase

ASOCIACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA GENÉTICA AL VIRUS PRRS Y LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS DE LÍNEAS COMERCIALES

Pena, R.N., Estany, J. y Fraile, L.

Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida, Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida. romi.pena@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es el patógeno más importante del complejo respiratorio porcino y la causa de un problema muy preocupante para el sector. Las cerdas infectadas con el virus PRRSV tienen más prevalencia de abortos y de nacidos muertos, mientras que los cerdos infectados a temprana edad desarrollan problemas respiratorios que ralentizan su crecimiento y los hace más susceptibles a otras enfermedades. En la actualidad no hay vacunas altamente eficaces para su control. Por tanto, el difícil manejo de esta enfermedad resalta la importancia de disponer de más herramientas en los programas de medicina preventiva. Una posible opción sería poder seleccionar animales resistentes a este virus. En este sentido, en un trabajo anterior, demostramos que existe variabilidad entre y dentro de tipo genético en relación con la resistencia al virus PRRSV (Pena et al., 2012). Por otra parte, se ha publicado recientemente el primer marcador genético (rs80800372) asociado a la resistencia genética a este virus. En particular, se asocia este marcador genético a la viremia (duración e intensidad) observada tras la infección con este virus. En concreto, este marcador permite explicar entorno al 15% de la varianza genética de este carácter (Boddicker et al., 2012). Estos mismos autores han descrito que este marcador exhibe efectos pleiotrópicos sobre crecimiento, donde la presencia del alelo resistente incrementa la ganancia de peso (28-70d) en animales expuestos al virus PRRSV.

Los objetivos del presente trabajo son: (i) estudiar la presencia y segregación del marcador rs80800372 en líneas de cerdos comerciales; y (ii) analizar su relación con caracteres productivos relacionados con el crecimiento y la composición de la canal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y datos fenotípicos: En el presente estudio se han utilizado muestras de ADN procedentes de cinco poblaciones no relacionadas (**Tabla 1**) de cerdos de raza Duroc (poblaciones A y B), Landrace x Large White (LDLW, poblaciones C y D) e Ibérica (Población E). Las poblaciones A y C fueron inoculadas experimentalmente con virus PRRSV vacunal (Pena et al., 2012) mientras que las otras tres son muestras de animales procedentes de granjas comerciales en las que no se había observado problemas clínicos asociados a la infección por este virus. De las primeras cuatro poblaciones se dispone de datos de peso a distintas edades, con los que se ha estimado la Ganancia Media Diaria (GMD). Además, en las poblaciones B y D también se registraron el peso y el porcentaje de magro y el espesor de grasa subcutánea de la canal.

Genotipado marcador genético: El marcador rs80800372 se ha genotipado en un termociclador de PCR a tiempo real ABI-7500 (*Life Technologies*) mediante una aproximación de discriminación alélica con sondas *TaqMan* fluorescentes específicas para cada alelo, siguiendo las indicaciones del fabricante (*Life Technologies*).

Análisis estadísticos: Debido al bajo número de animales con genotipo GG identificados, éstos no fueron incluidos en los análisis estadísticos. Se contrastó el efecto del genotipo rs80800372 sobre los valores fenotípicos para cada población por separado utilizando un modelo lineal que incluía el genotipo rs80800372 y el lote como efectos fijos y la edad al sacrificio como covariable (sólo en datos de canal). Las diferencias entre genotipos dentro de cada línea genética se contrastaron mediante un test *t* de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Segregación del marcador rs80800372 en diversas líneas de cerdo.

El marcador rs80800372 (4:g.139666819A>G) corresponde a un polimorfismo tipo SNP (substitución A>G) localizado en la región más distal del brazo largo del cromosoma 4 porcino. La presencia del alelo G se ha asociado a menor carga viral tras la inoculación de cepas muy virulentas de PRRSV (Boddicker et al., 2012).

Hemos podido confirmar la presencia de segregación para este marcador en cuatro de las cinco poblaciones seleccionadas, presentando todas ellas una frecuencia alélica similar para el alelo G, en torno a 0.20 (**Tabla 1**). En cambio, todos los cerdo Ibéricos analizados (n=41) fueron homocigotos para el alelo A.

En particular, en las dos poblaciones expuestas experimentalmente al virus PRRSV vacunal, los animales menos susceptibles a este virus (sin viremia detectable hasta los 42d post inoculación y sin anticuerpos séricos) presentan mayor frecuencia del alelo G (0.31) que los animales más susceptibles (positivos para viremia y anticuerpos; 0.18). Sin embargo, el número reducido de animales utilizado en este experimento no permite un análisis estadístico suficientemente potente como para detectar diferencias relevantes entre grupos.

Tabla 1. Genotipo y frecuencia del alelo menos presente (MAF) según tipo genético.

Población	Genética	N de lotes	N cerdos	Genotipo rs80800372			MAF
				AA	AG	GG	
A	Duroc	1	14	8	6	-	0.214
B	Duroc	7	617	414	185	18	0.179
C	LDLW	1	26	17	8	1	0.200
D	LDLW	2	53	46	7	-	0.066
E	Ibérico	1	41	41	-	-	0

Efecto del marcador rs80800372 sobre Ganancia Media Diaria

Debido a la diversidad de líneas utilizadas se han obtenido valores de GMD en varios tramos de crecimiento. El análisis de los datos ha mostrado una asociación significativa entre el genotipo rs80800372 y la GMD de algunos de estos tramos, confirmando el efecto de este gen sobre la ganancia de peso (**Tabla 2**). Sin embargo, es altamente destacable que la presencia del alelo G se asocia a un aumento de los valores de GMD sólo en los animales inoculados con el virus PRRSV (poblaciones A y C), observándose una tendencia contraria en los grupos no inoculados (poblaciones B y D), especialmente a edad temprana (**Tabla 2**).

Tabla 2. Medias mínimo cuadráticas (SE) de la Ganancia Media Diaria (GMD, g/día), según población y genotipo rs80800372

población A	AA	AG	p-value	población B	AA	AG	p-value
GMD 28-70d	664 (33)	680 (42)	0.77	GMD 80-160d	762 (8)	725 (12)	0.01
población C	AA	AG	p-value	GMD 120-160d	744 (12)	705 (19)	0.09
GMD 28-70d	825 (32)	928 (49)	0.09	GMD 80-180d	744 (5)	737 (8)	0.49
población D	AA	AG	p-value	GMD 120-180d	762 (5)	765 (8)	0.72
GMD 80-180d	842 (12)	733 (32)	0.003	GMD 160-180d	764 (2)	725 (18)	0.08
GMD 80-205d	836 (9)	753 (26)	0.005	GMD 80-205d	722 (5)	716 (8)	0.50
				GMD 160-205d	697 (10)	671 (16)	0.19

Efecto del marcador rs80800372 sobre caracteres de engrasamiento de la canal

Los caracteres de engrasamiento fueron tomados en la canal de los cerdos de las poblaciones B y D. Se observa como la presencia del alelo G afecta, en sentido negativo, al porcentaje de magro de la canal de la población B (**Tabla 3**). De forma paralela, los

animales AG presentan una mayor profundidad de la grasa subcutánea en comparación con los cerdos AA. También es muy relevante que el peso total de la canal no se vea afectada por el genotipo de este marcador, sugiriendo que el efecto sobre GMD pueda ser más importante a edades tempranas que en la última etapa de engorde.

Tabla 3. Efecto del genotipo *rs80800372* sobre caracteres de engrasamiento de la canal en las poblaciones B y D. Se muestran medias mínimo cuadráticas (SE) para ambos genotipos.

Fenotipos en canal	Población B			Población D		
	AA (n=414)	AG (n=185)	p-value	AA (n=46)	AG (n=7)	p-value
Peso canal (Kg)	93.49 (0.45)	93.36 (0.68)	0.87	104.57 (1.17)	101.09 (3.34)	0.34
Grasa dorsal (mm)	22.31 (0.18)	22.88 (0.26)	0.07	18.38 (0.50)	18.25(1.44)	0.93
% magro	44.17 (0.24)	43.27 (0.35)	0.03	51.06(0.62)	50.95(1.79)	0.95

Discusión general de los resultados.

Aunque el número de poblaciones y tipos genéticos analizados es limitado, nuestros resultados indican que el alelo resistente (G) para el virus del PRRSV está también presente en poblaciones españolas a frecuencias similares a las descritas por Boddicker et al. (2012) en animales híbridos comerciales de Estados Unidos. Los análisis de GMD sugieren un efecto indirecto favorable del alelo G sobre crecimiento en animales infectados por PRRSV mientras que el alelo A incrementaría la GMD en animales no infectados por este virus. Esta es una hipótesis que es necesario contrastar antes de proceder a utilizar este marcador en la selección por resistencia a PRRSV. En particular, un buen diseño en este sentido debería comparar GMD, dentro de línea, cerdos infectados y no infectados de los tres genotipos. En cualquier caso, los resultados obtenidos en este trabajo confirman, dadas las frecuencias de segregación alélica, el interés de analizar este marcador en nuestras poblaciones, así como, por su relación con GMD, las precauciones en su utilización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boddicker, N., Waide, E.H., Rowland, R.R.R., Lunney, J.K., Garrick, D.J., Reecy, J.M. & Dekkers, J.C.M. 2012. *J Anim Sci.* 90: 1733-1746
- Pena, R.N., Estany, J. & Fraile L. 2012. XVI Reunión de Mejora Genética, Ciudadilla de Menorca

Agradecimientos: Agradecemos la contribución de las empresas Selección Batallé y Vall Companys al material animal utilizado en este trabajo así como la colaboración del personal del *Centre d'Estudis Porcins* de Torrelameu (Leida) en el trabajo experimental en granja.

ASSOCIATION BETWEEN GENETIC RESISTANCE TO PRRS VIRUS AND TRAITS OF PIG PRODUCTION IN COMMERCIAL LINES

ABSTRACT: The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a serious concern for the pig sector as it promotes abortions in sows and respiratory problems, growth retardation and increases the probability to suffer other diseases in young pigs. As vaccines available are not highly effective there is a need to develop other tools in preventive medicine programs including selection for genetic resistance to this virus. We have previously shown that there is variability between and within genetic type regarding PRRSV resistance. Recently, the first genetic marker associated with genetic resistance to this virus has been published. This marker also exhibits pleiotropic effects on growth, where the presence of resistance-associated allele (G) increases weight gain in animals exposed to PRRSV. We show here that this marker segregates in five Spanish pig populations at frequencies similar to those of U.S. commercial hybrids. Data analysis of the average daily gain (ADG) suggest a possible protective effect of the G allele on growth in PRRSV-infected pigs while the A allele increases ADG in non-infected animals. This hypothesis needs to be contrasted before using this marker in PRRSV resistance selection. In particular, a good design should compare the ADG of the three genotypes in infected and uninfected pigs within each line.

Keywords: PRRSV, pig, resistance, marker

ELIMINACIÓN DE MUTACIONES DELETÉREAS EN PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN

M. A. R. de Cara¹, B. Villanueva, M.A. Toro y J. Fernández

¹ Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. de La Coruña, km. 7.5, Madrid 28040. Email: rodriguez.angeles@inia.es

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de los programas de conservación es maximizar la probabilidad de supervivencia de la población de interés (Frankham et al., 2002), lo cual se logra manteniendo la mayor diversidad genética a la vez que controlando el aumento en la consanguinidad. La pérdida de diversidad genética es un problema central en conservación y evolución, ya que es la que permite a las poblaciones adaptarse a cambios en su entorno. Además, las poblaciones en programas de conservación son normalmente pequeñas, y pueden tener mayores tasas de consanguinidad. Esto puede tener un efecto negativo en su eficacia, como se ha observado en especies que sufren depresión consanguínea en caracteres ligados a la eficacia, que puede llevarlas a extinción (Frankham et al. 1995; Saccheri y col., 1998).

La mejor estrategia para mantener la mayor diversidad genética posible en una población es optimizando las contribuciones (número de hijos que cada individuo debería contribuir a la próxima generación) para minimizar el parentesco global (Meuwissen, 1997; Grundy et al., 1998). Para la optimización de dichas contribuciones se usa normalmente el parentesco genealógico, si está disponible, pero también se puede usar el parentesco molecular. Este último ha probado ser más eficiente en mantener diversidad cuando se basa en paneles de marcadores densos (de Cara y col., 2011). Sin embargo, al mantener diversidad podemos estar manteniendo mutaciones deletéreas, reduciendo así la eficacia de la población.

Aquí probamos la eficiencia de tres estrategias para eliminar las mutaciones deletéreas en programas de conservación gestionadas bajo contribuciones de mínimo parentesco: Primero, forzando apareamientos consanguíneos para exponer las mutaciones recesivas y que la selección natural las elimine. Segundo, asumiendo que los marcadores con MAF (minimum allele frequency) más bajas son los más ligados a loci selectivos, los eliminamos del cálculo del parentesco molecular. Y tercero, gestionando con un parentesco calculado en grandes regiones homocigotas (ROH), que pueden ser consecuencia de barridos selectivos y mostrar selección reciente o aún actuando.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestras simulaciones comprenden dos partes: en la primera generamos una población base de censo efectivo de 1000 individuos en equilibrio mutación-selección-deriva, y en la segunda procedemos a la gestión de la población para mantener la máxima diversidad genética, en poblaciones de 100 individuos.

Para generar la población base, simulamos durante al menos 5000 generaciones una población de $N = 1000$ individuos (500 machos y 500 hembras) que se aparean al azar con reemplazamiento. El genoma está compuesto por 20 cromosomas, de 1 M cada uno. Cada cromosoma tiene 4000 loci bialélicos equidistantes de tres tipos: 1000 marcadores que usamos para la gestión, intercalados entre los 2000 loci neutrales no marcadores que usamos para medir diversidad y 1000 loci bajo selección. La eficacia es multiplicativa en los loci selectivos, y cada locus i tiene eficacia $1 - h_i s_i$ y $1 - s_i$, para los genotipos AA, Aa y aa, respectivamente. Los parámetros s_i y h_i son los coeficientes de selección y dominancia en el locus i , respectivamente.

Para los loci seleccionados, usamos dos modelos mutacionales, basados en la literatura de experimentos de acumulación de mutaciones. El primero es el que llamamos escenario de Mukai y se basa en los resultados obtenidos por Mukai y colaboradores (1972), de donde se deduce que las mutaciones deletéreas son muchas y de efecto pequeño. El segundo modelo mutacional está basado en resultados más recientes (Caballero y Keightley, 1994; García-Dorado y Caballero, 2000) y es el escenario que llamamos CGD, donde las mutaciones son mucho menos frecuentes, pero de efecto mucho mayor.

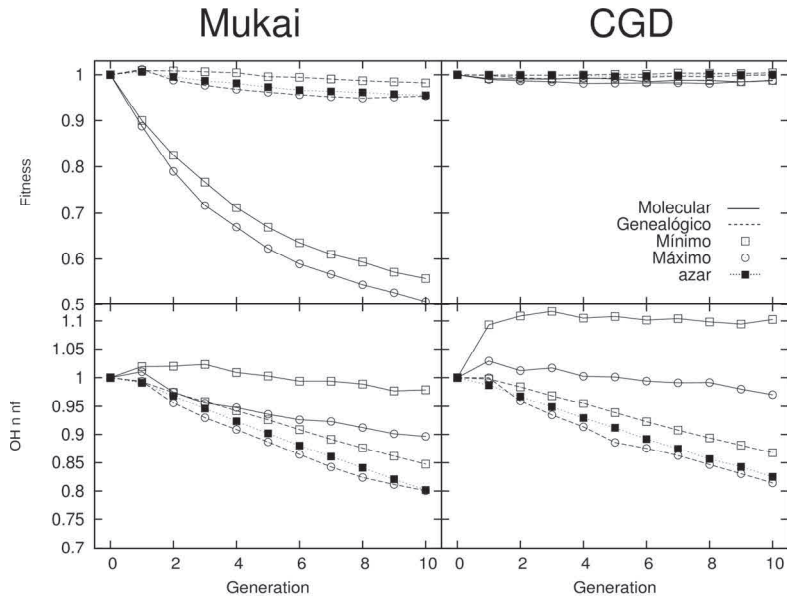


Figura 1: Resultados de heterocigosidad observada en loci neutrales inicialmente polimórficos y eficacia durante la gestión. Comparación en los escenarios de Mukai y de CGD, optimizando el parentesco genealógico, parentesco molecular, y usando apareamientos de mínimo parentesco, de máximo parentesco y gestionando al azar.

Cada generación se producen en promedio $2\lambda N$ mutaciones, sacadas de una distribución Poisson, y se distribuyen aleatoriamente entre los loci seleccionados e individuos (es decir λ es la tasa de mutación por genoma haploide y por generación), y dentro de ellos, en posiciones que no llevan ya un alelo deletéreo. Los parámetros usados para el escenario de Mukai son $\lambda = 0.5$, $\sigma = 0.05$, $\bar{h} = 0.35$ y $\beta = 1$, y para el escenario CGD son $\lambda = 0.03$, $\sigma = 0.264$, $\bar{h} = 0.20$ y $\beta = 2.3$, donde β es el parámetro de forma de la distribución Gamma de donde se sacan los coeficientes de selección. El número de mutaciones en marcadores y loci neutrales los sacamos de una distribución Poisson con media $2\mu N$, donde $\mu = 2.5 \times 10^{-3} n_M$ para marcadores y $\mu = 2.5 \times 10^{-3} n_N$ para loci neutrales (n_M y n_N son el número de marcadores y el número de loci neutrales por genoma haploide, respectivamente).

Cada generación calculamos el número de mutaciones en la población, y los distribuimos entre individuos y loci. Después sacamos un macho y una hembra al azar con reemplazo y los apareamos. Producimos gametos con una recombinación por Morgan. La eficacia de su progenie se compara con un número al azar en el intervalo (0,1), y si éste es menor que la eficacia, esta progenie sobrevive, y si no, muere. Este proceso se repite hasta generar de nuevo N individuos.

La población se gestiona entonces durante 10 generaciones, optimizando las contribuciones para minimizar el parentesco global ponderado por dichas contribuciones (Meuwissen 1997; Grundy et al. 1998). Para medir la eficiencia de la gestión en mantener diversidad, analizamos tres métodos: 1) combinación de contribuciones óptimas con apareamientos de parentesco mínimo, máximo y al azar, gestionando o bien con parentesco molecular o con parentesco genealógico; 2) contribuciones óptimas con parentesco molecular o parentesco genealógico, usando para el cálculo del parentesco molecular aquellos marcadores a frecuencias mayores que un cierto MAF y 3) contribuciones óptimas con parentesco calculado a partir de ROHs de distinta longitud.

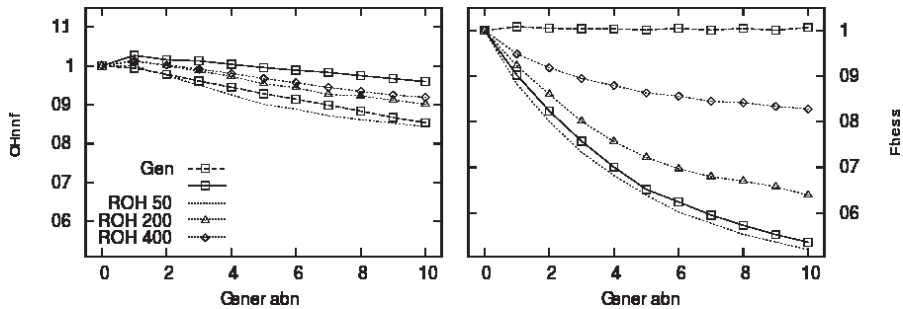


Figura 2: Resultado de la gestión en el escenario de Mukai con contribuciones óptimas, usando parentesco genealógico, parentesco molecular y parentesco ROH con distintos tamaños.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 podemos ver como la eficiencia de la gestión, medida como la heterocigosidad observada en loci neutrales no fijados en la población base, relativa a la que había inicialmente, es mayor usando el parentesco molecular. Sin embargo, mantener más diversidad mantiene más alelos deletéreos, y consecuentemente, en el escenario de Mukai donde la selección natural es menos eficiente en eliminar alelos recesivos, la gestión usando parentesco molecular lleva a una brusca caída en eficacia. Una vez decididas las contribuciones, los apareamientos de máximo parentesco tienen un efecto pequeño y negativo tanto en eficacia como en diversidad, y no observamos que se revierta la tendencia de caída en eficacia.

Usando sólo los marcadores a frecuencias más intermedias para el cálculo del parentesco molecular podemos mantener más eficacia, pero cuantos menos marcadores usemos, peor es el resultado de la gestión molecular en cuanto a mantener diversidad. Por último, en la figura 2 podemos ver como usando los ROHs, llegamos a resultados más equilibrados, ya que mantienen mucha más eficacia que una gestión basada en parentesco molecular, y la pérdida de diversidad comparada con esta gestión es pequeña.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Caballero A., Keightley P. (1994). *Genetics* 138: 883-900.- Frankham R. (1995). *Annu. Rev. Genet.* 29: 305-327. - Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.- Garcia-Dorado A., Caballero A. (2000). *Genetics* 155: 1991-2001. - Grundy, B., Villanueva, B. & Wooliams, J.A. 1998. *Gen. Res.* 72: 159-168. - Meuwissen, T.H.E. 1997. *J. Animal Science* 75: 934-940. - Mukai T., Chigusa S.I., Mettler L.E., Crow J.F. (1972). *Genetics* 72: 333-355.- Saccheri I., Kuusari M., Kankare M., Vikman P., Fortelius W., Hanski I. (1998). *Nature* 392: 491-494.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CGL2009-13278-C02-02.

PURGING DELETERIOUS MUTATIONS IN CONSERVATION PROGRAMMES

ABSTRACT: We study here the consequences in fitness and diversity of managing a population in a conservation programme. While using molecular coancestry to calculate optimal contributions can maintain more diversity than using genealogical coancestry, it does not distinguish on whether that diversity is neutral or deleterious, and can thus lead to a decrease in fitness if the initial population had a large inbreeding load. Here we also study the performance of using molecular coancestry measured only on markers at high frequency, or using a measure of coancestry based on runs of homozygosity. Our results show how managing a population with more polymorphic markers can maintain more fitness, but due to having fewer markers, less diversity is maintained. A balance between maintaining diversity and fitness using molecular data is achieved by managing the population using runs of homozygosity.

Keywords: Purging, optimal contributions, runs of homozygosity.

MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIANTE EL PARENTESCO MOLECULAR: INFLUENCIA DEL CENSO EFECTIVO Y LA DENSIDAD DE SNPS

Gómez-Romano¹, F., Villanueva, B., de Cara, M.A.R. y Fernández, J.

¹Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. de La Coruña, km. 7.5, Madrid 28040.

Email: gomez.fernando@inia.es

INTRODUCCIÓN

Mantener la diversidad existente en una población y reducir el incremento de la endogamia son los principales objetivos de un programa de conservación desde un punto de vista genético. El método más eficiente para conseguirlo es minimizar el parentesco promedio esperado, optimizando las contribuciones de los reproductores de una generación a la siguiente (Meuwissen, 1997; Grundy y col., 1998). El parentesco utilizado en la optimización se puede calcular a partir de la genealogía de los individuos de la población (IBD) o a partir de información molecular de estos individuos (IBS). De Cara y col. (2011) demostraron, mediante simulación estocástica, que la diversidad mantenida cuando se utiliza el parentesco molecular calculado a partir de un número elevado de SNPs es mayor que la mantenida cuando se utiliza el parentesco genealógico. La diversidad que es posible mantener mediante el uso de parentesco molecular depende del desequilibrio de ligamiento (LD) entre los marcadores y el resto de loci del genoma. Este LD a su vez depende tanto de la densidad de marcadores (d) como del censo efectivo de la población (N_e).

Durante los últimos años se han desarrollado chips de alta densidad con miles de SNPs para especies ganaderas. Para otras especies, a pesar de que la tecnología es cada vez más barata, tiene una gran importancia optimizar el número de marcadores para que sea asumible el gasto de genotipado y el uso del parentesco molecular sea una alternativa al uso del parentesco genealógico. Por tanto, es importante conocer la cantidad de SNPs necesaria para el parentesco molecular permita mantener al menos el mismo nivel de diversidad genética que el parentesco genealógico.

En este trabajo se investiga, mediante simulaciones, cómo afectan el censo efectivo y la densidad de marcadores a la efectividad del parentesco molecular en el mantenimiento de la diversidad genética en poblaciones sometidas a programas de conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio simulamos poblaciones de individuos con un genoma de 20 cromosomas de una longitud de 1 Morgan cada uno. Se simularon 2 tipos de loci bialélicos repartidos uniformemente a lo largo de cada cromosoma: loci marcadores, que se utilizaron para gestión, y loci no marcadores, que se utilizaron para la monitorización de la diversidad en términos de heterozigosidad esperada, heterozigosidad observada y diversidad alélica. Inicialmente se creó una población base ($t = 0$) en equilibrio de mutación – deriva mediante 5000 generaciones de panmixia. De esta manera se generó LD entre los loci. Posteriormente se llevaron a cabo 10 generaciones discretas optimizando las contribuciones para minimizar el parentesco (molecular o genealógico) en la siguiente generación. Se consideraron 4 censos efectivos ($N_e = 20, 40, 80$ y 160) y 7 densidades de SNPs ($d = 10, 30, 50, 100, 500, 1000$ y 2000 SNP/Morgan) generando tantos escenarios como combinaciones entre ambos parámetros. El LD generado fue mayor en los escenarios con densidades mayores y con N_e menores (Figura 1).

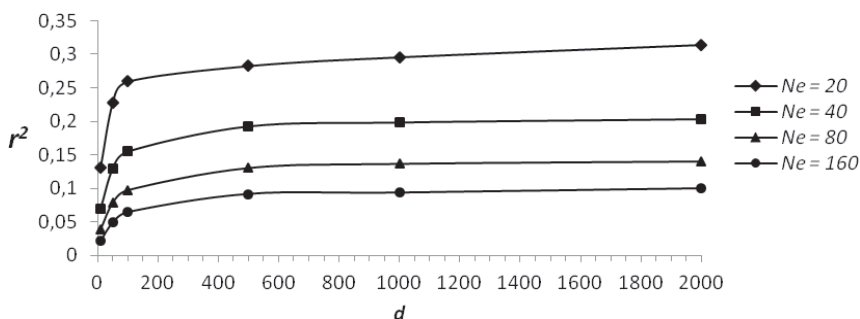


Figura 1. Desequilibrio de ligamiento medio (r^2) entre marcadores adyacentes en la generación inicial ($t = 0$) para diferentes densidades de marcadores (d) y censos efectivos (N_e).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se representa la diferencia entre la heterocigosidad observada mantenida utilizando parentesco molecular y genealógico para los diferentes valores de d y N_e .

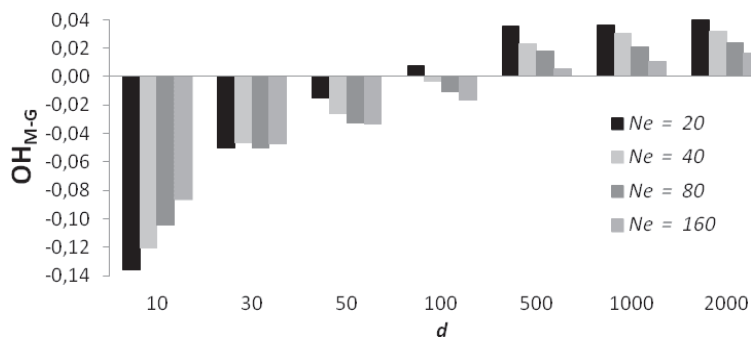


Figura 2. Diferencia entre heterocigosidad observada utilizando parentesco molecular o genealógico (OH_{M-G}) en la generación 10 de manejo, para diferentes densidades de marcadores (d) y censos efectivos (N_e).

Para $N_e = 20$, el manejo realizado utilizando parentesco molecular con $d = 100$ ya supera en eficacia el realizado utilizando parentesco genealógico. Para censos efectivos mayores, la densidad necesaria es también mayor ($100 < d < 500$). La densidad requerida para igualar el rendimiento del manejo molecular y genealógico en el mantenimiento de diversidad se estimó mediante interpolación lineal (Figura 3), obteniendo valores en torno a $3N_e$ SNP/Morgan. Con el aumento de la densidad de SNP, la adición de nuevos marcadores consigue cada vez un menor incremento porcentual de la diversidad mantenida (Figura 3). Un incremento en d de 10 a 100 SNP/Morgan lleva a un aumento en la heterocigosidad mantenida en $t = 10$ de entre un 8% ($N_e = 160$) y un 18% ($N_e = 20$), mientras que un incremento de 100 a 1000 SNP/Morgan solo la aumenta en un 3% en ambos casos. Para todos los N_e , el aumento de diversidad mantenida a partir de $d = 500$ es muy pequeño (Figura 3).

En conclusión, una densidad de $3N_e$ SNP/Morgan permitiría mantener la misma diversidad utilizando información molecular o genealógica. Teniendo en cuenta que las técnicas actuales de genotipado masivo permiten ya alcanzar esta densidad en muchas especies, se puede pensar que el parentesco molecular puede resultar una potente herramienta para la conservación de diversidad genética.

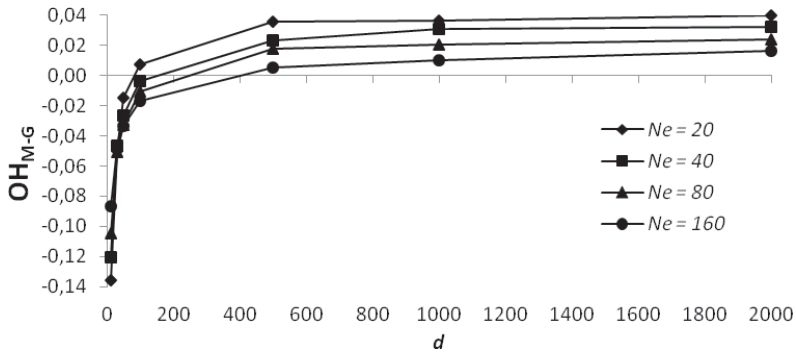


Figura 3. Diferencia entre heterozigosidad observada utilizando parentesco molecular o genealógico (OH_{M-G}) en la generación 10 de manejo, para diferentes densidades de marcadores (d) y censos efectivos (N_e).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Grundy, B., Villanueva, B., Wooliams, J.A. 1998. Gen. Res. 72: 159-168.
- Meuwissen, T.H.E. 1997. J. Anim. Sci. 75: 934-940.
- de Cara, M.A.J., Fernández, J., Toro, M.A., Villanueva, B. 2011. J. Anim. Breed. Genet. 128: 456-464.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CGL2009-13278-C02-02. Fernando Gómez-Romano disfruta de una beca FPI (Ministerio de Ciencia e Innovación).

MAINTAINING GENETIC DIVERSITY USING MOLECULAR COANCESTRY: THE EFFECT OF MARKER DENSITY AND EFFECTIVE POPULATION SIZE

ABSTRACT: The most efficient method for maintaining genetic diversity in populations under conservation programmes is to optimise, for each potential parent, the number of offspring left to the next generation that minimise global coancestry. Recent studies have shown that optimising contributions based on coancestry calculated from a large number of SNP markers could maintain higher levels of diversity than optimising contributions based on genealogical data. In this study we investigate how SNP density and effective population size impact the effectiveness of using molecular coancestry for maintaining diversity. The performance of molecular coancestry equalised the performance of genealogical coancestry when the SNP density was about 3 times the effective population size. However, the increasing SNP density had diminishing returns in maintained diversity. Most SNP chips already available for farm animals have enough density to allow marker coancestry to outperform genealogical coancestry in maintaining diversity in conservation programmes. The decreasing costs of developing SNP chips will make these densities to be feasible in a short-term horizon.

Keywords: diversity, molecular coancestry, marker density, effective population size.

RELACIONES GENOMICAS ENTRE LAS RAZAS OVINAS LECHERAS DEL PIRINEO OCCIDENTAL: LATXA Y MANECH

A. Legarra¹, G. Baloche¹, F. Barillet¹, J.M. Astruc², C. Soulas³, X. Aguerre³, F. Arrese⁴, L. Mintegi⁴, M. Lasarte⁵, I. Beltrán de Heredia⁶, E. Ugarte⁶

¹INRA, UR631. 31326 Castanet Tolosan, France
andres.legarra@toulouse.inra.fr

²IDELE. 31326 Castanet Tolosan, Francia

³CDEO. Route de Musculdy, Quartier Ahetzia, 64130 Ordiarp, Francia

⁴ARDIEKIN, Apdo 46, Vitoria-Gasteiz 01080.

⁵ASLANA. c/Aintziburu, Iza 31170

⁶NEIKER. Apdo 46, Vitoria-Gasteiz 01080.

INTRODUCCION

Las razas Latxa y Manech del Pirineo Occidental (País Vasco, Navarra, y Pyrénées Atlantiques) han sido tradicionalmente consideradas como la misma "raza" con diferentes subpoblaciones. En cambio, las razas Basco-Béarnaise y Carranzana, en la misma región, han sido tradicionalmente consideradas como razas diferentes. Desde los años 70 en Francia y los años 80 en España dichas poblaciones cuentan con sus propios esquemas de mejora que gestionan gran parte de la población. En España: Latxa Cara Rubia (LCR), Latxa Cara Negra del País Vasco (LCN-EUS), Latxa Cara Negra de Navarra (LCN-NAF) y Carranzana (CAR); en Francia: Manech Tête Noire (MTN), Manech Tête Rousse (MTR) y Basco-Béarnaise (BB). Morfológicamente, MTN y ambas LCN son similares (faneros oscuros), así como MTR y MCR (faneros claros).

Las relaciones entre estas poblaciones a ambos lados de los Pirineos son conocidas. Siempre ha habido superposición entre las zonas de influencia de LCN-EUS / LCN-NAF, así como entre LCN-NAF/MTN. Del mismo modo, durante los años 70, numerosas ovejas de LCR fueron compradas en España y llevadas a Francia, donde se unieron a la población de MTR; más recientemente, el programa de mejora de la LCR ha utilizado regularmente carneros de MTR (Ugarte et al., 1996). De hecho ciertos carneros de LCR son descendientes de carneros de MTR (no se da el caso contrario). Este flujo génico continúa y se busca voluntariamente debido a que el programa de MTR es más antiguo, con mayores progresos genéticos y niveles de producción. Así, por ejemplo, en el período 2001-2010, se han usado 163 carneros MTR en LCR, con un promedio de 6.8 hijas. Los intercambios de este tipo son casi inexistentes en LCN/MTN.

Entre 2010 y 2012 se desarrolló el proyecto de cooperación transfronteriza (www.poctefa.eu) GENOMIA (www.genomia.net). Su objetivo: reforzar la cooperación entre los esquemas de selección de este conjunto de razas, abordando en uno de sus puntos la posibilidad de valoraciones genéticas conjuntas mediante "chips" de marcadores moleculares (OvineSNP50 BeadChip) Dichas valoraciones conjuntas aportan mayor precisión que las valoraciones intra-población cuando las poblaciones están estrechamente conectadas (Lund et al., 2011; Karoui et al., 2012). El estudio que aquí se presenta está incluido dentro de este proyecto y se realizó específicamente para evaluar, mediante análisis de genotipados, si estas poblaciones ovinas están conectadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se genotiparon carneros de los últimos 10-12 años de cada raza (excepto CAR). Los genotipos se verificaron por *call rate*, equilibrio de Hardy-Weinberg y conflictos padre-hijo. Finalmente, se guardaron los marcadores polimórficos en el conjunto de las 7 poblaciones. El fichero resultante está descrito en la Tabla 1. Adicionalmente se introdujo la raza Lacaune (LAC) para completar la información. En la raza Lacaune hay dos sub-poblaciones poco conectadas desde los años 70.

Posteriormente se realizaron dos análisis. El primero analiza la conservación de los segmentos cromosómicos (es decir, la “forma” del desequilibrio de ligamiento entre marcadores) a través de las diferentes razas (The Bovine HapMap Consortium, 2009). En este análisis, dentro de cada raza (intra), y para todos los pares de marcadores dentro de un rango de distancias, se calculó el estadístico r_{LD} que mide el desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores; posteriormente, entre cada par de razas, se calculó la correlación r entre los pares de r_{LD} . Si la correlación r es 1, el patrón de desequilibrio de ligamiento se ha conservado completamente. El análisis se realizó a 10, 50, 100 y 250 kb, obteniéndose resultados similares. Los resultados se muestran visualmente en la Figura 1a mediante la función *heatmap2* del paquete R *gplots* (que incluye un dendrograma basado en la distancia $1-r$).

El segundo análisis realizado fue un análisis de componentes principales (McVean, 2009) de la matriz **G** de parentesco genómico (VanRaden, 2008). Este análisis encuentra pseudo-poblaciones (o grandes “familias”) en los datos. Se calculó **G** y extrajeron sus dos primeros componentes principales mediante *preGSf90* (Aguilar et al., 2011). Los resultados se muestran en la figura 1b.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1a muestra que tal y como se esperaba, los cromosomas están fuertemente conservados tanto dentro de la raza Lacaune, así como entre MTR y LCR. La raza BB se encuentra aislada, mientras que MTN y LCN muestran una concordancia intermedia.

La figura 1b muestra claramente una estructuración en poblaciones, que se encuentra incluso a pesar de que no se ha introducido ninguna variable “raza” en el análisis. La estructuración concuerda muy bien con la distribución geográfica. El primer componente principal separa la raza LAC (cuyas dos subpoblaciones están nítidamente separadas) de las razas pirenaicas; el segundo componente separa las razas pirenaicas entre sí. Se puede observar que la raza BB se encuentra aislada, mientras que las MTN y LCN están más próximas, aunque diferenciadas unas de otras. Sin embargo, en MTR/LCR hay una superposición de las dos manchas: eso indica claramente que las dos poblaciones están íntimamente ligadas.

Todos estos resultados están de acuerdo a lo que ya se conoce sobre el intercambio habido entre razas, e indican que una evaluación conjunta resultará en más aumento de precisión para MTR/LCR que para MTN/LCN. La raza BB, al estar aislada, no se beneficiaría.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

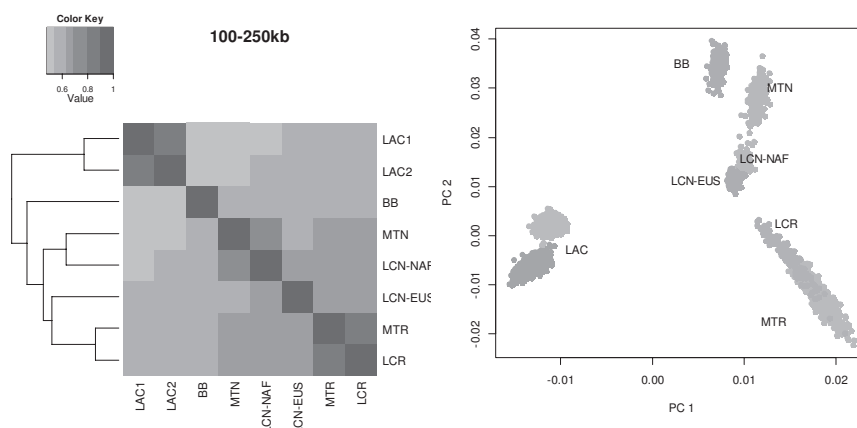
•Aguilar, I., Misztal, I., Legarra, A., & Tsuruta, S. 2011. *J. Anim. Breed. Genet.* 128: 422-428. • The Bovine HapMap Consortium. 2009. *Science* 324:528-532. • Karoui, S., Carabaño, M. J., Díaz, C., & Legarra, A. 2012. *Gen. Sel. Evol.* 44: 39. • Lund, Mogens S., et al. 2011. *Gen. Sel. Evol.* 43: 43. • McVean, G. 2009. *PLoS Gen.* 5: e1000686. • Ugarte, E., Urarte, E., Arrese, F., Arranz, J., Silio, L., & Rodriguez, C. 1996. *J. Dairy Sci.* 79: 2268-2277. • VanRaden, P. M. 2008. *J. Dairy Sci.* 91: 4414-4423.

Agradecimientos: a los proyectos GENOMIA (POCTEFA) y Roquefort'In (FUI). Project partially supported by the platform bioinformatics Toulouse Midi-Pyrenees.

Tabla 1. Distribución de genotipos entre razas

BB	MTN	MTR	LAC	LCN-EUS	LCR	LCN-NAF
321	330	1907	6145	197	265	164

Figura 1. Conservación de segmentos cromosómicos y dendrograma asociado (1a,izquierda), y análisis de componentes principales (1b, derecha).



GENOMIC RELATIONSHIPS ACROSS DAIRY SHEEP BREEDS IN THE WESTERN PYRENEES: LATXA AND MANECH

ABSTRACT: The relationships between seven dairy sheep populations: Latxa Cara Rubia (LCR), Latxa Cara Negra del País Vasco (LCN-EUS), Latxa Cara Negra de Navarra (LCN-NAF), Manech Tête Noire (MTN), Manech Tête Rousse (MTR), Basco-Béarnaise (BB) and Lacaune (LAC) have been analysed by means of SNP markers. We studied the conservation of linkage disequilibrium patterns across breeds and analysed principal components of the genomic relationship matrix. Results show a high relationship between both Lacaune strains and also between French and Spanish MTR/LCR. This could result in higher accuracy of joint genomic evaluations for those breeds.

INTROGRESION DE GENES DE CEBÚ DEL SAHEL EN LAS POBLACIONES BOVINAS TRIPANOTOLERANTES DE BURKINA FASO

I. Álvarez¹, A. Traoré², I. Fernández¹, M. Cuervo³, T. Lecomte⁴, H.H. Tamboura², F. Goyache¹.

¹SERIDA-Deva, C/ Camino de Rioseco 1225, 33394-Gijón (Asturias), e-mail:

fgoyache@serida.org; ²INERA-CNRST, 04 BP 8645 Ouagadougou 04, Burkina Faso;

³SERPA S.A., C/ Luis Moya Blanco 26, E-33203, Gijón (Asturias); ⁴SEBO / JVL - Ranch de Kolo, R.D. de Congo

INTRODUCCIÓN

La progresiva desertización del oeste de África está facilitando la introgresión de genes de ganado del Sahel en las poblaciones ruminantes domésticos de las zonas húmedas del esa región del continente africano (Álvarez et al., 2009; Traoré et al., 2009, 2011). Esta introgresión puede poner en riesgo la principal característica de los ruminantes domésticos tripanotolerantes (ver Geerts et al., 2009). La tripanotolerancia es un carácter heredable que puede definirse como la capacidad para sobrevivir, reproducirse y producir en condiciones de riesgo de tripanosomiasis sin necesidad de productos para el control del vector o el parásito. Las poblaciones de *Bos taurus* africano se consideran resistentes a la tripanosomiasis ya que poseen la capacidad para iniciar y mantener respuestas contra el establecimiento del tripanosoma llegando a la curación espontánea. Esto contrasta con la respuesta a la enfermedad de los pequeños ruminantes que son capaces de mantener su capacidad productiva en condiciones de parasitemia y por ello se consideran, simplemente, tripano-resilientes. La tripanosomiasis es el mayor obstáculo para el desarrollo de una ganadería sostenible en el África húmeda y sub-húmeda y se considera una de las causas más importantes del hambre y la pobreza en el África sub-Sahariana (http://www.africa-union.org/Structure_of_the_Commission/depPattec.htm).

El proyecto CORAF-WECARD 03.GRN.16 pretende: a) la caracterización fenotípica y molecular de 11 razas bovinas del oeste de África en Mali, Burkina Faso, Benín y Guinea; b) el diagnóstico y grado de afectación por tripanosomiasis bovina de esas poblaciones teniendo en cuenta diferentes características agro-ecológicas; c) el establecimiento de patrones geográficos que caractericen el grado de introgresión de genes de cebú más allá del Sahel y su importancia en la presencia de tripanosomiasis; y d) realizar recomendaciones a ganaderos, gobiernos y agencias internacionales para el manejo y aprovechamiento sostenible del ganado bovino tripanotolerante. El proyecto CORAF-WECARD 03.GRN.16 está íntimamente ligado al proyecto MICINN-FEDER AGL2011-27585, que pretende un mayor conocimiento de las bases genéticas de la tripanotolerancia bovina mediante aplicación de técnicas de gen candidato. En esta comunicación se llevan a cabo análisis preliminares que permitan establecer la utilidad de una batería de marcadores microsatélite utilizada en bovino europeo para conseguir los objetivos previstos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre de 32 cebúes africanos tripanosusceptibles (5 Danakil, 6 Raya Azebo y 21 Boran), 31 individuos de raza Lobi (representante en Burkina Faso de la raza Baoulé), 23 individuos de raza N'Dama de Burkina Faso y 42 muestras de animales de raza N'Dama procedentes de cuatro rebaños explotados en Congo por la empresa JVL. La raza N'Dama se considera el representante más destacado del ganado tripanotolerante africano. Los animales de raza Lobi se muestrearon en el área de Sidéradougou, en la zona de influencia del río Mouhoun (Volta Negro). Las muestras de raza N'Dama de Burkina Faso se obtuvieron en el área de Mangodara en la frontera con Costa de Marfil. La población N'Dama de Congo deriva de un rebaño originario de Guinea y establecido en el país en los años 30 del siglo XX. Los individuos disponibles se genotiparon con los 34 marcadores microsatélite utilizados previamente por Bozzi et al. (2012). En ese trabajo puede encontrarse una descripción detallada de los métodos laborales empleados. A efectos descriptivos se

han calculado diversos parámetros que caracterizan la variabilidad genética de las poblaciones analizadas utilizando el programa MolKin 3.1 (Gutiérrez et al., 2005).

En la forma descrita por Traoré et al. (2012) las contribuciones relativas de dos poblaciones parentales a una población supuestamente cruzada se estimarán utilizando los programas LEADMIX (Wang, 2003) y LEA (Chikhi et al., 2001). Ambos programas difieren en los métodos empleados y en las asunciones realizadas. LEADMIX aplica métodos máximo-verosímiles a un modelo simple en que dos poblaciones parentales divergen de un ancestro común para crear, posteriormente, una tercera población híbrida asumiendo que las frecuencias alélicas de las poblaciones parentales no son independientes. LEA aplica metodologías bayesianas a un modelo que asume que las poblaciones parentales se encuentran en equilibrio demográfico y que sus frecuencias alélicas antes de la hibridación son independientes. En esta comunicación las poblaciones parentales 1 y 2 serán las poblaciones de cebú africano y de N'Dama del Congo, respectivamente, mientras que las poblaciones Lobi y N'Dama de Burkina Faso serán consideradas poblaciones derivadas. En todo caso, la población Lobi será también analizada considerando la población N'Dama de Burkina Faso como población parental 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variabilidad genética de las poblaciones analizadas es comparable (Tabla 1) excepto para la población N'Dama del Congo, que es la única sometida a un programa de selección. La mayor diferenciación se encuentra entre esta población y el cebú africano ($D_R = 0,123$). La menor diferenciación no se encuentra entre las dos poblaciones N'Dama (0,064) sino entre la población N'Dama de Burkina Faso y el cebú africano (0,054). Los coeficientes de mestizaje estimados con la población de cebú africano se muestran en la Tabla 2. Si se consideran como población parental 2 los individuos N'Dama de Burkina Faso, el coeficiente de mestizaje estimado para la raza Lobi es bajo (LEADMIX) o nulo (LEA), mientras que pasa a ser importante (entre el 25,6% -LEA- y el 39,1% LEADMIX) cuando la población parental 2 es la población N'Dama de Congo. A pesar de que la población N'Dama de Burkina Faso se localiza al sur de la zona de muestreo de los individuos Lobi, la proporción de genotipo cebú en la población N'Dama de Burkina Faso fue mayor (aproximadamente el 47%). A pesar de que la batería de microsatélites utilizada ha demostrado ser útil para la consecución de los objetivos previstos, el presente análisis ha evidenciado los problemas a que se puede enfrentar el proyecto CORAF-WECARD 03.GRN.16: a) la diferenciación entre poblaciones en el oeste de África puede deberse más a la distancia geográfica que tipo racial, lo que dificulta la obtención de patrones claros de mestizaje; y b) la introgresión de genes de ganado del Sahel hacia el sur sigue un patrón complejo que no es explicable únicamente por la latitud (Traoré et al., 2012). Será necesario incorporar al análisis nuevas poblaciones parentales tanto tripanotolerantes como tripanosusceptibles que permitan encontrar patrones de mestizaje explicables por las condiciones agroecológicas de la región estudiada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, I., Traoré, A., Tambourá, H. H., Kaboré, A., Royo, L. J., Fernández, I., Ouédraogo-Sanou, G., Sawadogo, L., Goyache, F. 2009. Anim. Biotech. 20: 47-57.
- Bozzi, R., Álvarez, I., Crovetto, A., Fernández, I., De Petris, D., Goyache, F. 2012. Animal 6: 203-211.
- Chikhi, L., Bruford, M. W., Beaumont, M.A. 2001. Genetics 158: 1347-1362.
- Geerts, S., Osaer, S., Goossens, B., Faye, D. 2009. Trends Parasitol. 2009 25: 132-138.
- Gutiérrez, J. P., Royo, L. J., Álvarez, I., Goyache, F. 2005: J. Hered. 96: 718-721.
- Traoré, A., Álvarez, I., Tambourá, H. H., Fernández, I., Kaboré, A., Royo, L. J., Gutiérrez, J. P., Ouédraogo-Sanou, G., Sawadogo, L., Goyache, F. 2009. Livest. Sci. 123: 322-328.
- Traoré, A., Álvarez, I., Fernández, I., Pérez-Pardal, L., Kaboré, A., Ouédraogo-Sanou, G. M. S., Zaré, Y., Tamboura H. H., Goyache, F. 2012. BMC Genetics 13: 35 doi:10.1186/1471-2156-13-35.
- Wang, J. 2003. Genetics 164:747-765.

Agradecimientos: Este trabajo se financió parcialmente mediante los proyectos MICINN-FEDER AGL2011-27585 y CORAF-WECARD - World Bank 03.GRN.16.

Tabla 1. Parámetros descriptivos de la variabilidad genética en las poblaciones analizadas: heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) y su desviación estándar ($de_{(H_e)}$), número medio de alelos por locus (k) y número medio de alelos por locus ajustado por tamaño muestral a 42 copias ($k_{(42)}$). Asimismo, se muestran las distancias de Reynolds con las poblaciones de cebú africano ($D_{R(CA)}$) y N'Dama del Congo ($D_{R(NC)}$)

Población	H_o	H_e	$de_{(H_e)}$	k	$k_{(42)}$	$D_{R(CA)}$	$D_{R(NC)}$
Lobi	0,679	0,642	0,009	6,1	5,6	0,084	0,059
N'Dama (BF)	0,689	0,688	0,009	6,7	6,6	0,054	0,064
Cebú africano	0,718	0,705	0,007	6,9	6,4		0,123
N'Dama (Congo)	0,575	0,560	0,008	5,5	4,9	0,123	
TOTAL	0,657	0,649	0,004	8,7	6,7		

Tabla 2. Proporción de genotipo cebú africano en las razas Lobi y N'Dama de Burkina Faso (BF) considerando como población parental 2 la población N'Dama del Congo o la propia población N'Dama de Burkina Faso. Los coeficientes se han calculado mediante los programas LEADMIX y LEA y se presentan, respectivamente, como media de la distribución posterior y desviación estándar (d.e.) y solución máximo-verosímil e intervalo de confianza al 85%

Derivada	LEADMIX		LEA	
	Parental 2	Media	d,e,	coeficiente [+95%, +95%]
Lobi	N'Dama (BF)	0,111	0,037	0,001 [0,009, <0,001]
	N'Dama (Congo)	0,391	0,037	0,256 [0,323, 0,191]
N'Dama (BF)	N'Dama (Congo)	0,471	0,058	0,475 [0,537, 0,412]

INTROGRESSION OF SAHELIAN ZEBU GENES INTO THE TRYPANOTOLERANT BOVINE POPULATIONS OF BURKINA FASO

ABSTRACT: Due to progressive desertification, introgression of Sahelian zebu cattle genes into native *Bos taurus* populations of West Africa jeopardise a major inheritable trait: trypanotolerance. The aim of this note is to asses the usefulness of a set of microsatellites to estimate admixture coefficients in two cattle populations of Burkina Faso: Lobi (32 samples) and N'Dama (23). Samples of African zebu (32) and N'Dama from Congo (42) were used as parental populations. The higher differentiation (Reynolds' distance) found was between the African zebu and the N'Dama from Congo ($D_R = 0.123$) while the two N'Dama populations and the pair Burkinabé N'Dama and African zebu were poorly differentiated (0.064 and 0.054, respectively). The zebu admixture coefficients estimated for the Lobi breed were low or null when the other parental population was the Burkinabé N'Dama. However, they become non negligible when the N'Dama from Congo was used (from 25.6% to 39,1%). The admixture coefficients estimated for the Burkinabé N'Dama population were higher that those estimated for the Lobi breed (roughly 47%).

Keywords: West Africa, zebu cattle, trypanotolerant cattle, introgression

VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN LAS POBLACIONES FUNDADORAS DE PONI ASTURCÓN

I. Álvarez¹, I. Fernández¹, D. García², M. Cuervo³, L. Lorenzo², F. Goyache¹.

¹SERIDA-Deva, C/ Camino de Rioseco 1225, 33394-Gijón (Asturias), e-mail: fgoyache@serida.org; ²ACPRA, Centro Ecuestre El Asturcón 33194-Oviedo (Asturias); ³SERPA S.A., C/ Luis Moya Blanco 26, E-33203, Gijón (Asturias).

INTRODUCCIÓN

La recuperación del poni Asturcón está bien documentada (García-Dory, 1980). Tras una grave recesión a mediados del siglo XX, la conservación de la raza se inició en los años 70 utilizando los animales de capa negra explotados en la Sierra del Suevo (Oriente de Asturias). Esta iniciativa causó cierta controversia dado que históricamente se consideraba que el Asturcón tenía más frecuentemente capa castaña y se explotaba fundamentalmente en el Occidente de Asturias (García-Dory, 1980). El pequeño tamaño de la población inicial hizo necesario incorporar nuevas yeguas fundadoras durante los años 90 a partir de rebaños de las zonas bajas del Oriente asturiano y el área de los Picos de Europa. Finalmente, el número de yeguas fundadoras con descendencia en el Libro Genealógico del poni Asturcón fue de cincuenta 50 (Royo et al. 2007; Álvarez et al., et al., 2012).

Al inicio del siglo XXI, la asociación de criadores (ACPRA) incluyó en una nueva sección del Libro Genealógico unos centenares de animales de capa castaña (Royo et al., 2007; Álvarez et al. 2011). Sin embargo, la controversia sobre el programa de conservación continuó. Marcadores de ADN mitocondrial asignaron al poni Asturcón, de capa negra o castaña, a la familia haplotípica D de Jansen et al. (2002; Royo et al., 2005). Sin embargo, la variabilidad encontrada en el Asturcón de capa negra era mucho mayor que en la estirpe de capa castaña, sugiriendo que la estirpe de capa negra podría haber tenido una mayor influencia de razas equinas alóctonas. Recientemente, Álvarez et al. (2012) han analizado en profundidad la variabilidad genética materna del poni Asturcón de capa negra tanto en la población fundadora como en la población presente.

En esta comunicación se comparan los haplotipos de las 37 líneas maternas fundadoras analizadas por Álvarez et al. (2012) con 42 nuevas secuencias obtenidas de líneas fundadoras del poni Asturcón de capa castaña. Se pretende conocer si existen diferencias en la variabilidad del ADN mitocondrial en las poblaciones fundadoras de las dos estirpes de poni Asturcón y si esas posibles diferencias tienen relación con la estirpe o la geografía.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han obtenido muestras de sangre de 42 yeguas fundadoras de la sección de capa castaña del Libro Genealógico del poni Asturcón en 3 zonas geográficas aisladas entre sí: Sierra de La Bobia (13; concejos de Oscos, Vegadeo, Castropol, Illano, Boal y Coaña (northwestern Asturias); Sierra de Carondio (9; concejos de Allande, Tineo, Villayón, Valdés y Navia); y Sierra de El Aguión (20; concejos de Valdés, Salas y Cudillero). Las 37 líneas fundadoras del Asturcón de capa negra analizadas en Álvarez et al. (2012) se asignaron a las poblaciones fundadoras "Sueve" (26) y "no-Sueve" (11). La primera incluye las yeguas fundadoras recuperadas en la Sierra del Suevo en los primeros años 80 mientras que la segunda incluye las líneas fundadoras maternas recuperadas en zonas bajas del Oriente de Asturias y área de los Picos de Europa y registradas en los años 90.

Los trabajos de laboratorio y secuenciación se realizaron en la forma descrita en Álvarez et al. (2012) utilizando un secuenciador ABI 3130 DNA y sus programas de análisis. Las secuencias se alienaron usando el programa CLUSTAL incluido en el programa MEGA 5.03 (Tamura et al., 2007). Los análisis se restringieron a 380 bp y las posiciones nucleotídicas se numeraron de acuerdo con la secuencia de referencia X79547. Los haplotipos identificados se asignaron a los grupos definidos por Jansen et al. (2002). Los haplotipos no

identificados en Álvarez et al. (2012) se numeraron comenzando por el haplotipo (Hap) 16. Los análisis estadísticos y la estima de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) se realizaron utilizando el programa Arlequín 3.5 (Excoffier et al. 2010). Los análisis AMOVA se realizaron ajustando dos (población o estirpe) o tres (población dentro de estirpe) niveles jerárquicos. La confianza estadística de los valores obtenidos se estimó mediante permutaciones utilizando 1000 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 79 secuencias analizadas proporcionaron 16 haplotipos definidos por 33 sitios variables (Tabla 1; ver Álvarez et al. 2012 para más detalles). Aunque las dos estirpes de poni Asturcón sólo comparten 8 haplotipos, estos sumaron el 76% y el 81% de las muestras disponibles en ambas estirpes. La diversidad haplotípica y nucleotídica en la estirpe castaña ($0,027 \pm 0,006$ y $0,021 \pm 0,011$, respectivamente) son ligeramente más altas que las de la estirpe negra ($0,024 \pm 0,005$ y $0,016 \pm 0,009$, respectivamente). Los análisis AMOVA señalaron que la mayor parte de la variabilidad se debía a los individuos muestreados (entre el 96,4% y el 99,8% dependiendo del modelo ajustado). Sin embargo, ni la estirpe ni la población muestreada resultaron fuentes de explicación estadísticamente significativas de la variabilidad genética materna (valores Φ_{ST} de 0,037 y 0,018). El modelo de tres niveles jerárquicos no produjo resultados diferentes.

El ADN mitocondrial no permite la diferenciación de razas de caballos por la gran variabilidad presente en la especie debido a su compleja domesticación y su capacidad de movimiento (Jansen et al., 2002). La herencia del ADN mitocondrial es prácticamente uniparental y tiene un carácter estocástico que puede amplificarse por cuellos de botella locales. Sin embargo, la presente comunicación indica que a pesar del aislamiento reproductivo de las poblaciones analizadas y la acusada recesión de sus censos no se han producido procesos de deriva que permitan la diferenciación de las poblaciones.

Se puede concluir que no sería posible una diferenciación entre estirpes de poni Asturcón mediante marcadores de ADN mitocondrial. Las dos estirpes de poni Asturcón parecen provenir de la misma población ancestral de yeguas que, a su vez, tendría una composición genética materna representativa de una posible población ancestral de yeguas de la península ibérica (Royo et al. 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, I., Fernández, I., Lorenzo, L., Payeras, L., Cuervo, M., Goyache, F. 2012. *J. Anim. Breed. Genet.* 129: 271-279.
- Álvarez, I., Royo, L.J., Pérez-Pardal, L., Fernández, I., Lorenzo, L., Goyache F. 2011. *Livest. Sci.* 135: 199-204.
- Excoffier, L., Lischer H. E. L. 2010. *Mol. Ecol. Res.* 10: 564-567.
- García-Dory, M. A. 1980. Asturcón. Caballo de los astures. Ediciones Caja de Ahorros de Asturias, Oviedo.
- Jansen, T., P. Forster, M. A. Levine, H. Oelke, M. Hurles et al., 2002. *PNAS* 99: 10905-10910.
- Pérez-Gutiérrez L. M., De la Peña A., Arana P. 2008. *Anim. Genet.* 39: 506-514.
- Royo, L.J., Álvarez, I., Beja-Pereira, A., Molina, A., Fernández, I., Jordana, J., Gómez, E., Gutiérrez, J.P., Goyache, F. 2005. *J. Hered.* 96: 663-669.
- Royo, L. J., Álvarez, I., Gutiérrez, J. P., Fernández, I., Goyache, F. 2007. *Livest. Sci.* 107: 162-169.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

Agradecimientos: Este trabajo se financió parcialmente mediante el proyecto MICINN-INIA RZ2008-00010. Los autores agradecen la colaboración de la asociación de criadores ACPRA (<http://www.asturcones.com/>).

Tabla 1. Frecuencias de los haplotipos identificados en cinco poblaciones fundadoras de poni Asturcón. Los haplotipos de Hap_16 a Hap_20 no se habían identificado en Álvarez et al. (2012). Se proporcionan, para cada población, los siguientes parámetros: número de muestras (n), número de haplotipos identificados (k), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). La abreviatura sd corresponde a la desviación estándar.

Haplo- tipo	Haplo- grupo	Poblaciones					Total
		El Aguión	Carondio	La Bobia	Sueve	no-Sueve	
Hap_1	D ₁	3	7	11	9	2	32
Hap_2	D ₃	1				1	2
Hap_3	D ₁				2		2
Hap_4	G				3		3
Hap_5	D ₂	2		1		2	5
Hap_6	A ₃		2	1	4	1	8
Hap_7	C ₂	1		1	7	1	10
Hap_8	A ₁		1		1	1	3
Hap_9	A ₆					1	1
Hap_10	A ₁		1			1	2
Hap_11	C ₁					1	1
Hap_16	A ₁			2			2
Hap_17	-			1			1
Hap_18	A ₅	1	1	3			5
Hap_19	D ₁		1				1
Hap_20	A ₇	1					1
n		9	13	20	26	11	79
k		6	6	7	6	9	16
h		0.111	0.077	0.050	0.039	0.091	0.013
$sd_{(h)}$		0.052	0.030	0.016	0.011	0.039	0.002
π		0.016	0.017	0.016	0.02	0.024	0.019
$sd_{(\pi)}$		0.010	0.010	0.009	0.011	0.013	0.010

MITOCHONDRIAL DNA VARIABILITY IN THE FOUNDER POPULATIONS OF THE ASTURCÓN PONY

ABSTRACT: A 380 bp fragment of the horse D-loop region was analysed in 42 founder mare samples of the bay-coated Asturcón pony obtained in three different, isolated and mountainous areas: branch of “La Bobia” (13), branch of “Carondio” (9) and branch of “El Aguión” (20). These sequences were compared with the information provided by 37 founder matriline of black-coated Asturcón assigned to the “Sueve” (26) and the “out-of-Sueve” (11) founder populations. The aim of this note was to ascertain the differences in founder mtDNA diversity between the two strains of the Asturcón pony and if such differences have geographical consistency. Both haplotypic (0.027 ± 0.006) and nucleotide (0.021 ± 0.011) diversity were higher in bay-coated than in black-coated Asturcón (0.024 ± 0.005 and 0.016 ± 0.009 , respectively). AMOVA analyses failed in assessing any statistically differentiation among Asturcón geographical populations or strains. Differentiation among strains or population took low and non-significant values (Φ_{ST} of 0.037 and 0.018, respectively). Differentiation between Asturcón pony strains using mtDNA marker would not have clear support. The two strains of the Asturcón pony breed likely derive from the same ancestral mare population.

Keywords: D-loop, Genetic variability, Asturcón, Founders

ESTIMAS GENÓMICAS DE PARENTESCO Y CONSANGUINIDAD EN UNA ANTIGUA PIARA CONSANGUÍNEA DE CERDO IBÉRICO

Saura¹, M., Fernández¹, A., Rodríguez¹, M.C., Toro², M.A., Barragán¹, C., Fernández¹, A.I. y Villanueva¹, B.

¹Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Carretera de la Coruña Km 7.5, 28040 Madrid, Spain, email: saura.maria@inia.es

²Departamento de Producción Animal, ETS Ingenieros Agrónomos, Ciudad Universitaria 28040 Madrid, Spain

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la diversidad genética y el incremento de la consanguinidad son requerimientos cruciales en los programas de conservación. El marco de actuación general para controlar la pérdida de variabilidad y evitar la depresión consanguínea se basa en controlar las tasas de consanguinidad y parentesco, o lo que es lo mismo, manejar el censo efectivo poblacional (N_e).

Dentro de las razas de porcino, el cerdo ibérico representa la más emblemática del Mediterráneo y una de las más importantes del mundo desde un punto de vista económico. A lo largo de la década de los sesenta, las poblaciones de cerdo ibérico sufrieron un acusado declive, aunque la expansión de los mercados ha conseguido revertir esta tendencia. La estirpe Guadyerbas, una de las más antiguas y actualmente la única representante del tipo negro lampiño, se encuentra en serio peligro de extinción. La estirpe se ha conservado en una piara experimental que se ha mantenido aislada desde 1944, con un exhaustivo control de la genealogía, constituyendo un recurso genético de incalculable valor.

En general, la evolución de la diversidad genética se ha medido utilizando la información del pedigrí, o utilizando marcadores microsatélites en los casos en que éste no estuviera disponible. Este tipo de información molecular es limitada, y su aplicación para mantener la variabilidad genética ha sido cuestionada en diversos estudios. El reciente desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación y genotipado masivo, permite identificar miles de polimorfismos nucleotídicos sencillos (SNPs) teniendo en cuenta información relevante que los microsatélites ignoran.

En este trabajo se ha utilizado el chip porcino PorcineSNP60 BeadChip (Illumina) para obtener estimas genómicas de parentesco, consanguinidad y censo efectivo para la estirpe Guadyerbas. Estas estimas moleculares se compararon con las equivalentes obtenidas a partir de la genealogía y a partir de marcadores microsatélites. Por último, se ha evaluado la eficiencia de la información genómica aplicada a programas de manejo para maximizar la diversidad genética como alternativa al uso de la genealogía.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se genotiparon 227 animales Guadyerbas nacidos entre 1992 y 2011 con el chip de Illumina que, de acuerdo con la última versión del mapa porcino, comprende 62163 pruebas distribuidas a lo largo de los 18 autosomas y 2 cromosomas sexuales. El filtrado de los datos se realizó con el programa GenomeStudio (Illumina). Tras aplicar los controles de calidad, el set de datos incluyó 219 muestras con genotipos fiables para 35519 SNPs. De estos individuos, 30 disponían también de genotipos para 57 microsatélites (Toro y col. 2002).

El coeficiente de parentesco molecular entre dos individuos i y j (f_{Mi}) se calculó como:

$$f_{Mij} = (1/L) \sum_{l=1}^L \left[\left(\sum_{k=1}^2 \sum_{m=1}^2 I_{lk(i)m(j)} \right) / 4 \right]$$

donde L es el número de marcadores y $I_{lk(i)m(j)}$ es la identidad del alelo k -ésimo del individuo i con el alelo m -ésimo del animal j en el locus l , que toma valor de 1 si los alelos son idénticos y de 0 si no lo son. El coeficiente de consanguinidad molecular para el individuo i se calculó como $F_{Mi} = 2f_{Mi} - 1$ (es decir, como la proporción de genotipos homocigotos). Los coeficientes de parentesco (f_G) y consanguinidad (F_G) genealógicos se calcularon utilizando el algoritmo de Meuwissen y Luo (1992). Las tasas de parentesco (f_y) y consanguinidad (F_y) (molecular y genealógico) anuales se computaron regresando el logaritmo neperiano de $(1 - f)$ o $(1 - F)$ sobre el año de nacimiento. Las pendientes de las rectas de regresión equivalen a $-f_y$ y $-F_y$, que multiplicadas por $-L$ (siendo L el intervalo generacional igual a 3 años) dan

las correspondientes tasas por generación (f y F). El censo efectivo se calculó como $N_{e_f} = 1/2 f$ o $N_{e_F} = 1/2 F$, utilizando tanto datos moleculares como genealógicos. Desde 1982, la estrategia adoptada para mantener la diversidad genética en el programa de conservación de Guadyerbas ha sido realizar apareamientos de mínimo parentesco genealógico. En este contexto, se evaluó la eficiencia de los marcadores de alta densidad en el manejo de poblaciones en conservación como alternativa al uso de la información genealógica. Se utilizaron datos empíricos de una generación (12 machos y 47 hembras) y se evaluaron dos criterios de optimización de apareamientos: minimización del parentesco molecular (MC_M) y minimización del parentesco genealógico (MC_G). Las restricciones impuestas implicaron un diseño balanceado en el que todos los individuos contribuían a la siguiente generación y que se ajusta a lo que se lleva a cabo en la práctica. Con objeto de clarificar cuál de los dos criterios es más eficiente, se midió el parentesco molecular y genealógico promedios que se alcanzaba con cada uno de ellos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la eliminación de los SNPs monomórficos para la raza de cerdo ibérico, cerca del 45% de los SNPs fueron monomórficos en Guadyerbas, en consonancia con lo que se espera de una población aislada de censo tan reducido. El promedio de los coeficientes de parentesco y consanguinidad moleculares ($0,82 \pm 0,015$ y $0,81 \pm 0,016$, respectivamente) fueron casi el doble que los coeficientes genealógicos ($0,42 \pm 0,047$ y $0,39 \pm 0,037$), aunque las tasas de parentesco molecular y genealógico fueron muy similares, al igual que ocurrió con las tasas de consanguinidad. No obstante, f y F fueron diferentes y por tanto difirieron también las estimas de N_e calculadas a partir de f (10 individuos) y de F (16-18 individuos). Esto se debe al tipo de manejo al que se ha sometido a la población, en el que se fuerzan apareamientos de mínimo parentesco, desviándose del apareamiento aleatorio.

La correlación entre f_M y f_G fue muy elevada (0,90), no así tanto entre F_M y F_G (0,68). El hecho de que la correlación entre parentescos fuese más alta podría tener relación con una mayor dispersión de los datos en el caso del parentesco genealógico (rango de $f_G = 0,41$; rango de $F_G = 0,16$). Estudios previos con marcadores microsatélites enfatizan la importancia de la varianza de los coeficientes genealógicos como el factor determinante para obtener una alta correlación (Slate y col. 2004). Sin embargo, en este estudio la varianza de los coeficientes genealógicos fue muy baja (0,0022 para f_G y 0,0014 para F_G), sugiriendo que en aquellos casos en que se utilizan miles de marcadores, la varianza de los coeficientes genealógicos no es el factor determinante de la magnitud de la correlación. De hecho, en el grupo de individuos con información de genealogía, SNPs y microsatélites, la correlación entre el parentesco molecular obtenido con SNPs y el parentesco genealógico resultó ser significativamente más elevada (0,86) que la equivalente utilizando microsatélites para estimar el parentesco molecular (0,67). También se observó que la predicción del parentesco genealógico a partir del molecular fue mucho más precisa utilizando SNPs (0,95) que utilizando microsatélites (0,82) (Figura 1).

El desarrollo de nuevas tecnologías de genotipado masivo ha transformado el paradigma de que la genealogía es el parámetro más apropiado para medir la diversidad genética. Contrariamente a lo sugerido en estudios basados en microsatélites (Fernández y col. 2005), estudios recientes han resaltado los beneficios de los chips densos de SNP para mantener variabilidad genética (de Cara y col. 2011). A pesar de que en este estudio los criterios de minimizar el parentesco molecular (MC_M) o minimizar el parentesco genealógico (MC_G) mostraron resultados similares en términos de parentesco global (tanto molecular como genealógico), las parejas escogidas por cada uno de los criterios sólo coincidieron en el 30% de los casos. Esto se debe a que, aunque el parentesco molecular tiene la habilidad de discriminar entre individuos con el mismo grado de parentesco genealógico, el manejo de la población ha dado lugar a una gran reducción en la varianza del parentesco, por lo que la ventaja de utilizar el parentesco molecular no se ha trasladado en la práctica.

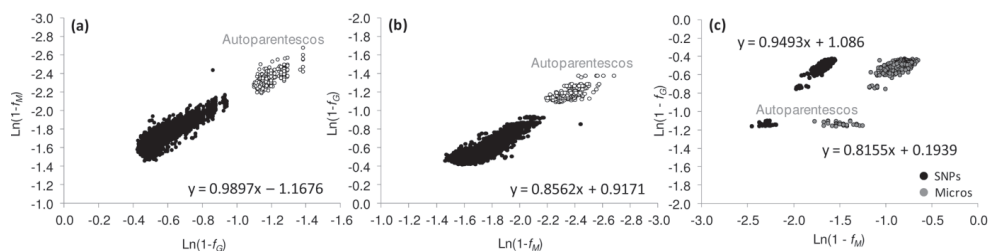
La población analizada en este estudio dispone de información completa y precisa del pedigrí, una situación muy inusual. Nuestros resultados sugieren que en ausencia de esta información, la utilidad de la información molecular a partir de chips de SNPs para mantener diversidad genética es indiscutible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Meuwissen, T. & Luo, Z. 1992. Genet Sel Evol 24:305-313.
- Toro, M. A., Barragán, C., Óvilo, C., Rodríguez, J., Rodríguez, M. C. & Silió L. 2002. Cons Gen 3:309-320.
- Fernández, J., Villanueva, B., Pong-Wong, R. & Toro, M. A. 2005. Genetics 170:1313-1321.
- De Cara, M. A., Fernandez, J., Toro, M. A. & Villanueva, B. 2011. J Anim Breed Genet 128:456-464.
- Slate, J., David, P., Dodds, K. G., Veenvliet, B. A., Glass, B. C., Broad, T. E. & McEwan, J. C. 2004. Heredity 93:255-265.

Agradecimientos: Los autores agradecen a L. Silió su implicación y sugerencias en el trabajo y a R. Benítez y F. García su aporte técnico. Trabajo financiado por el proyecto INIA RZ2010-00009-00-00. M. Saura disfruta de un contrato Juan de la Cierva del MINECO.

Figura 1. Predicción del parentesco molecular (f_{Mi} ; estimado con datos de SNPs) a partir del parentesco genealógico (f_G) (a), y viceversa (b), para los 219 Guadyrbas analizados. Predicción del parentesco genealógico a partir de los dos tipos de parentesco molecular (SNPs y microsatélites), para los 30 individuos con información adicional de marcadores microsatélites (c).



GENOME-WIDE ESTIMATES OF COANCESTRY AND INBREEDING IN A CLOSED HERD OF ANCIENT IBERIAN PIGS

ABSTRACT: Maintaining genetic variation and controlling the increase in inbreeding are crucial requirements in animal conservation programs. As a general rule, the most widely accepted strategy to implement in conservation programs is to maximize the effective population size by minimizing the global coancestry obtained from the pedigree. When genealogical information is absent, microsatellites have been traditionally the markers of choice to characterize genetic variation, with questionable results. The development of high-throughput genotyping techniques states the necessity of reviewing the paradigm that genealogy is the best parameter to measure genetic diversity. In this study the Illumina PorcineSNP60 BeadChip was used to obtain genome-wide estimates of rates of coancestry and inbreeding and effective population size for an ancient strain of Iberian pigs which is now in serious danger of extinction. These estimates were compared with those obtained from microsatellite and from pedigree data. Estimates of coancestry and inbreeding computed from the SNP chip were strongly correlated with genealogical estimates and these correlations were substantially higher than those between microsatellite and genealogical coefficients. Molecular coancestry computed from SNP information was a better predictor of genealogical coancestry than coancestry computed from microsatellites. Our results indicate that genome-wide information represents a useful alternative to genealogical information for measuring and maintaining genetic diversity.

Keywords: coancestry, effective population size, genome-wide, Iberian pig.

DETECCIÓN DE HUELLAS DE SELECCIÓN EN SEIS LOCI RELACIONADOS CON LA PIGMENTACIÓN EN CABRA

Badaoui, B., Manunza, A., D'Andrea, M., Pilla, F., Capote, J., Jordana, J., Ferrando, A., Martínez, A., Delgado, J.V., Landi, V., Gómez, M., Pons, A., El Ouni, M., Amills, M., Vidal, O.¹

¹Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona. Campus Montilivi, Girona. E-mail: oriol.vidal@udg.cat.

INTRODUCCIÓN

La pigmentación es carácter fenotípico fácilmente observable que puede tener efectos relevantes sobre la viabilidad de un organismo, y en algunas especies los genes que la determinan pueden encontrarse bajo selección. Por ejemplo, en humano se relaciona la ventaja selectiva de la pigmentación con el efecto protector de la radiación UV y su papel en la síntesis de la vitamina D₃ (Jablonski y Chaplin, 2010), mientras que en el ratón *Peromyscus polionotus* se debe al camuflaje (Hoekstra et al., 2006). En animales domésticos probablemente el color de la capa ha sido seleccionado desde la domesticación (Fang et al., 2009) y los genes implicados son un buen modelo para estudiar la selección artificial.

En este trabajo hemos analizado la diversidad de 6 genes que afectan la pigmentación en mamíferos (*MC1R*, *ASIP*, *TYR*, *TYRP1*, *TYRP2* y *KIT*) en un panel de 18 razas caprinas, con el objetivo de detectar posibles huellas genéticas causadas por selección artificial. Además, para delimitar posibles efectos de distribución o de deriva, hemos reconstruido la estructura filogeográfica de las poblaciones incluidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para caracterizar polimorfismos se han secuenciado individuos de 10 razas distintas. Los fragmentos analizados son de 0.8 kb, 3.5 kb, 0.7 kb y 1.3 kb en los genes *MC1R*, *KIT*, *TYRP2* y *TYR* caprinos, respectivamente. Para los genes *ASIP* y *TYRP1* se han utilizado polimorfismos descritos previamente (Badaoui et al., 2011).

El genotipado de los polimorfismos encontrados se ha llevado a cabo en 516 individuos de 18 razas distintas mediante Sequenom MassARRAY iPLEX, en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen, Santiago de Compostela). Estas poblaciones cubren 5 áreas geográficas distintas: Italia, Península Ibérica y Baleares, Islas Canarias, Norte de África y Suiza.

La heterocigosidad observada ha sido calculada mediante el paquete R Genetics (<http://cran.r-project.org/web/packages/genetics/index.html>), opción *genotype*, y el déficit o exceso de heterocigotos con Genepop (Rousset, 2008). La herramienta cSNP de Panther se ha utilizado para las predicciones de efectos fenotípicos in silico (Thomas et al., 2003), y la huella de selección se ha identificado mediante la aproximación FST-outlier implementada en los programas BayeScan y Lositan (Fdist) (Foll y Gaggiotti, 2008). Para el análisis de estructura poblacional se ha utilizado un análisis de coordenadas principales (PCA), un PCA discriminante (DPCA) y el programa Structure v. 2.3.3 (Pritchard et al., 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La resecuenciación permitió la identificación de 10 SNPs nuevos, que incluyen 5 mutaciones que causan cambio de aminoácido y una mutación sin sentido (Tabla 1). En conjunto, el gen que muestra más niveles de variabilidad (especialmente, mutaciones no sinónimas) es *MC1R*.

Los resultados de genotipado en el panel de razas han sido analizados para detectar huellas de selección, y en los dos métodos utilizados los resultados indican que hay selección direccional en los genes *MC1R* y *KIT*, mientras que *TYR* y *TYRP2* estarían bajo selección balanceada/purificadora (Tabla 2).

El papel fundamental de *TYR* y *TYRP2* en la síntesis de pigmentos justificaría la selección purificadora. Sin embargo, no se puede descartar una posible selección balanceada, tal y como se ha demostrado en la oveja Soay, en la cual se seleccionan genotipos heterocigotos (Gratten et al. 2012).

Los SNP del gen *MC1R* con evidencias fuertes de selección direccional son c.673C>T, c.748G>T y c.764G>A, que en el análisis funcional in silico de cSNP involucran cambios funcionales en la proteína (Tabla 1). Es importante destacar que el SNP c.673C>T presenta una asociación con pigmentación de manchas rojas en la raza Girgentana, y un SNP en este gen, no genotipado en este estudio, es probablemente la causa de las variaciones entre negro y caoba de la raza Murciano-Granadina (Fontanesi et al., 2009). Todo esto sugiere un papel determinante del gen *MC1R* en la determinación del color en la especie caprina.

Un objetivo esencial de este trabajo es investigar el impacto de la selección sobre el color de la capa en las relaciones genéticas entre las 18 razas analizadas. ¿Es posible que la inclusión de SNP seleccionados en los análisis filogeográficos altere la agrupación de razas en función de su color?

Los patrones geográficos producidos por sucesos demográficos y deriva genética pueden ser substancialmente modificados (e incluso borrados) por la selección. Este podría ser el caso en animales domésticos como la cabra, en los cuales razas de localidades distantes pueden ser seleccionadas por el mismo color (produciendo una "fijación convergente" del mismo juego de alelos) y, alternativamente, razas cercanas ser seleccionadas por colores distintos.

Los resultados de los análisis filogeográficos muestran que las razas utilizadas en este análisis se agrupan en función de su origen y no de su color, y se observa una diferenciación clara entre las razas canarias y del norte de África versus las razas europeas. Nuestros datos, en concordancia con un análisis previo de 29 SNP en genes de la pigmentación (Nicoloso et al., 2012) muestran que marcadores no neutrales pueden reflejar correctamente la historia de una población, dependiendo del impacto relativo de la selección y la deriva en las frecuencias alélicas.

En general, los criterios de selección por color en las especies domésticas están completamente desligados de la geografía, y por tanto, la cabra es una excepción. Esto puede ser debido a distintas causas. Primero, una selección poco intensa (que parece posible, dado que individuos de una misma raza pueden tener pigmentaciones diversas) podría disminuir su influencia en la estructura de las poblaciones. Segundo, probablemente hay un cierto nivel de heterogeneidad genética en los fenotipos de color, y distintos alelos pueden ser responsables de patrones similares de razas de razas diferentes. Esta heterogeneidad podría incrementar la estructura filogeográfica. Y tercero, la pigmentación en caprino tiene una herencia poligénica, con interacciones entre loci, y un grado de complejidad que puede limitar la eficacia de la selección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badaoui, B., D'Andrea, M., Pilla, F., Capote, J., Zidi, A., Jordana, J. et al. 2011. *Biochem Genet* 49: 523-532. • Fang, M., Larson, G., Ribeiro, H.S., Li, N. & Andersson, L. 2009. *PLoS Genet* 5: e1000341. • Foll, M. & Gaggiotti, O. 2008. *Genetics* 180: 977-993. • Fontanesi, L., Beretti, F., Riggio, V., Dall'Olio, S., González, E.G., Finocchiaro, R. et al. 2009. *BMC Genet* 10: 47. • Gratten, J., Pilkington, J.G., Brown, E.A., Clutton-Brock, T.H., Pemberton, J.M. & Slate, J. 2012. *Mol Ecol* 21: 2977-2990. • Hoekstra, H.E., Hirschmann, R.J., Bunday, R.A., Insel, P.A. & Crossland, J.P. 2006. *Science* 313: 101-104. • Jablonski, N.G. & Chaplin, G. 2010. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (Suppl 2): 8962-8968. • Nicoloso, L., Negrini, R., Ajmone-Marsan, P. & Crepaldi, P. 2012. *Animal* 6: 41-49. • Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. *Genetics* 155: 945-959. • Rousset, F. 2008. *Mol Ecol Resources* 8: 103-106. • Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A. & Narechania, A. 2003. *Genome Res* 13: 2129-41.

Agradecimientos: trabajo financiado por el INIA, proyecto RZ2007-00005-C02-01

Tabla 1. Polimorfismo de cuatro genes caprinos involucrados en la pigmentación y valores predictivos de la aplicación cSNP (Panther database).

Gen	Polimorfismo	Cambio AA	subPSEC ¹	Pdel ²
<i>KIT</i>	c.1284T>G	K428Q	-3.85	0.70
	c.1887T>C	-	-	-
<i>MC1R</i>	c.673C>T	Q225X	-	-
	c.676A>G	K226E	-2.99	0.49
	c.748G>T	V249F	-6.12	0.95
	c.764G>A	G255D	-6.78	0.97
<i>TYR</i>	c.769C>A	P257T	-2.20	0.31
	c.1455A>G	-	-	-
<i>TYRP2</i>	c.900T>C	-	-	-
	c.996C>T	-	-	-

¹Valor subPSEC (logaritmo negativo de la ratio de probabilidad entre el alelo salvaje y el mutante en una posición), indica importancia funcional si es inferior a -3.

² Pdel, probabilidad que una mutación tenga efecto deletéreos.

Tabla 2. Detección de huellas de selección en genes caprinos que afectan la pigmentación mediante Lositan y BayeScan.

Gene		LOSITAN ¹		BAYESCAN ANALYSIS ²				
		P (simul)	Prior odds of the neutral model = 1			Prior odds of the neutral model = 10		
			Prob	q _{val}	α	Prob	q _{val}	α
<i>KIT</i>	c.1284T>G	0.999	0.934	0.023	0.692	0.306	0.234	0.221
	c.1887T>C	0.951	0.540	0.071	0.259	0.068	0.372	0.027
<i>MC1R</i>	c.673C>T	0.999	1.000	0.000	1.647	0.999	0.000	1.564
	c.676A>G	0.002	0.433	0.121	-0.187	0.083	0.310	-0.042
	c.748G>T	0.987	0.982	0.007	0.811	0.636	0.088	0.499
	c.764G>A	1.000	0.938	0.017	1.261	0.350	0.168	0.461
<i>TYR</i>	c.769C>A	3e-06	1.000	0.000	-1.825	0.999	0.000	-1.942
	c.1455A>G	0.000	1.000	0.000	-1.794	1.000	0.000	-1.907
<i>TYRP1</i>	c.483C>T	0.118	0.291	0.218	-0.028	0.046	0.425	-0.009
<i>TYRP2</i>	c.900T>C	0.000	0.982	0.004	-1.143	0.918	0.032	-1.185
	c.996C>T	0.000	0.982	0.009	-0.953	0.921	0.020	-1.031
<i>ASIP</i>	c.376T>G	0.107	0.301	0.174	-0.028	0.043	0.469	-0.008

¹Lositan evalúa la relación entre FST y la heterocigosidad esperada para identificar loci outliers. P(simul) ≤ 0.05 indica evidencias de selección balanceada/purificadora, y P(simul) ≥ 0.95 es indicativa de selección direccional. Los SNP con valores 0.05 < P(simul) < 0.95 són neutros.

²Prob = probabilidad posterior del modelo incluyendo selección; q_{val} = tasa mínima de falsos descubrimientos en que un locus puede ser significativo; α = coeficiente α estimado, indica la fuerza y dirección de la selección (valores positivos = selección direccional, valor negativo = selección purificadora o balanceada).

SIGNATURES OF SELECTION IN SIX COLOR GENES OF GOAT

ABSTRACT: Our goal was to investigate if selection for this phenotype has left a detectable genetic signature in goats. Ten mutations, plus 2 other ones detected in previous studies were genotyped in 560 goats representing 18 breeds from Italy, Spain, Canary Islands and North Africa. We detected significant evidences of directional selection at the *MC1R* and *KIT* genes, and of balancing/purifying selection at *TYR* and *TYRP2* loci. However, population structure and phylogeographic analyses, considering both neutral and non-neutral SNP, demonstrated that breeds cluster according to their geographic origin (and not to their coat color).

Keywords: goat, pigmentation, selection, drift

AVANCES EN LA INFERENCIA DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL EN PRESENCIA DE INDIVIDUOS EMPARENTADOS

S. T. Rodríguez-Ramilo^{1,3}, M. A. Toro² y J. Fernández³

¹CONAFE. Ctra. de Andalucía, Km. 23,6. 28340, Madrid

²Dpto. de Producción Animal. ETSI Agrónomos. UPM. 28040, Madrid

³Dpto. de Mejora Genética Animal. INIA. Ctra. La Coruña Km. 7,5. 28040, Madrid

E-mail: jmj@inia.es

INTRODUCCIÓN

Los algoritmos de agrupamiento Bayesianos (Pritchard et al., 2000; Corander et al., 2004) son una herramienta computacional muy empleada para inferir estructura genética poblacional. Básicamente, estas metodologías Bayesianas actúan minimizando los desequilibrios de Hardy-Weinberg y de ligamiento dentro de cada subpoblación. Como consecuencia de esta característica, la mayoría de estas metodologías asumen implícitamente que los individuos muestreados en las distintas subpoblaciones no están emparentados. Sin embargo, especialmente en poblaciones con un censo reducido o especies con una elevada fecundidad, es muy probable que existan (y se muestreen) individuos emparentados en una misma subpoblación. Por lo tanto, las asunciones de equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento en las metodologías de agrupamiento Bayesianas no se cumplirán, lo que puede reducir la precisión de estos métodos a la hora de inferir la estructura genética poblacional (Anderson y Dunham, 2008; Rodríguez-Ramilo y Wang, 2012).

En el presente estudio se comparó mediante simulación por ordenador el efecto que produce la existencia de individuos emparentados sobre la precisión de dos metodologías para inferir estructura genética poblacional. El primer método evaluado fue el algoritmo Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), y la segunda metodología evaluada está basada en la maximización de la distancia genética entre subpoblaciones (Maximisation of Genetic Distance; MGD) y, por tanto, no asume ni equilibrio de ligamiento ni de Hardy-Weinberg (Rodríguez-Ramilo et al., 2009).

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos simulados

Se simularon metapoblaciones compuestas por $n = 3$ o 5 subpoblaciones de 50 individuos cada una. Se incluyeron 10 (20) marcadores de tipo microsatélite (con 20 alelos) o 100 (200) SNP bialélicos. Las frecuencias alélicas de la metapoblación se generaron asumiendo una distribución Dirichlet. A partir de estas frecuencias y el coeficiente de diferenciación (F_{ST}) deseado (se simularon grados de diferenciación de $F_{ST} = 0,1$ y $0,2$), las frecuencias alélicas de cada subpoblación también se generaron a partir de una distribución Dirichlet. Para crear una estructura de parentescos se realizó una generación previa en la que los genotipos de los individuos con una relación de parentesco determinada (hermanos, medios hermanos, y no emparentados) se generaron para cada marcador siguiendo las reglas de transmisión mendeliana. Se simularon casos con sólo individuos no emparentados, con 1 o 2 familias en la misma subpoblación o 2 familias en subpoblaciones diferentes. El tamaño familiar fue de 4 y 16 individuos. En el caso de familias de medios hermanos solamente se simuló el escenario con 10 microsatélites. Se realizaron 20 réplicas de cada combinación de parámetros.

Algoritmos evaluados

Se evaluó la proporción de réplicas en las que STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) y MGD (Rodríguez-Ramilo et al., 2009) identificaron el número correcto de subpoblaciones (3 o 5).

Para la evaluación del método implementado en el STRUCTURE se empleó la proporción de ascendencia (Q) de cada individuo i ($i = 1, \dots, N$) perteneciente a cada cluster j ($j = 1, \dots, K$). Para cada individuo i , el cluster con el mayor valor de Q es el cluster al que ese individuo pertenece. La media de los valores Q_{ij} para todos los individuos i pertenecientes al cluster j se denomina $\bar{Q}^{(j)}$, y el menor valor de $\bar{Q}^{(j)}$ a través de los clusters evaluados es $\bar{Q}^{(smc)}$. El número de clústeres inferido fue el mayor valor de K en el que $\bar{Q}^{(smc)} > 0,8$. Los parámetros empleados para ejecutar el STRUCTURE fueron 5.000 muestras de *burn-in* y 10.000 usadas para calcular la distribución. Se empleó el modelo *admixture* y la opción de frecuencias alélicas correlacionadas. En todos los demás parámetros se dejaron los valores por defecto. El rango de K s evaluado fue desde dos hasta el número real de subpoblaciones más uno.

El método MGD implementa un algoritmo de *simulated annealing* para la optimización. Se usaron como parámetros 10.000 soluciones alternativas por temperatura (T) y un máximo de 250 diferentes valores de T . La tasa de descenso de la temperatura y la temperatura inicial fueron 0,9 y 0,00001, respectivamente. Para cada escenario, el rango de K s evaluado fue desde dos hasta seis y el número de K inferido se estimó mediante una aproximación similar a la propuesta por Evanno et al. (2005) pero adaptada para las distancias genéticas (ver Rodríguez-Ramilo et al., 2009 para más detalles).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la proporción de réplicas en las que el STRUCTURE (columna izquierda) y MGD (columna derecha) infieren $K = 3$ cuando $n = 3$ en presencia de familias de hermanos, los dos coeficientes de diferenciación considerados y usando 10 o 20 microsatélites. La proporción de K correctos es elevada en ambas metodologías en situaciones en las que no existen individuos emparentados y en casos con familias de 4 hermanos. Sin embargo, en las situaciones con 16 hermanos por familia, la proporción de réplicas en las que se estima K correctamente es mayor en MGD que con el STRUCTURE. En las dos metodologías la precisión con 20 microsatélites es mayor que con 10 microsatélites. Además, con un coeficiente de diferenciación elevado la precisión de ambos métodos mejora.

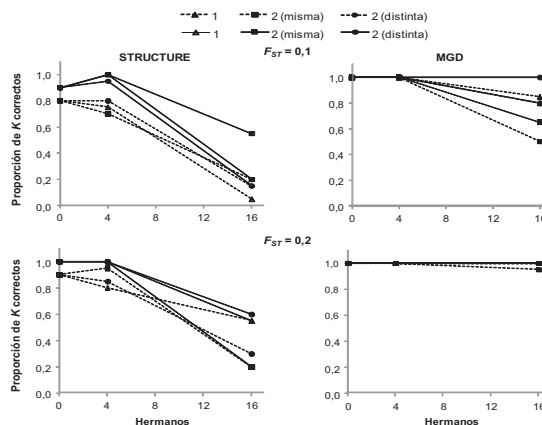


Figura 1. Proporción de réplicas en las que el STRUCTURE (columna izquierda) y MGD (columna derecha) infieren $K = 3$ cuando $n = 3$ en el caso de hermanos y distintos niveles de diferenciación. Las líneas discontinuas indican 10 microsatélites. Las líneas continuas indican 20 microsatélites. Los triángulos representan una familia, los cuadrados indican dos familias en la misma subpoblación, y los círculos representan dos familias en subpoblaciones diferentes.

La Figura 2 muestra la proporción de réplicas en las que el STRUCTURE (columna izquierda) y MGD (columna derecha) infieren $K = 3$ cuando $n = 3$ en los casos con familias

de medios hermanos con distintos coeficientes de diferenciación y 10 microsatélites. En general, el comportamiento de ambas metodologías es muy similar al caso de las familias de hermanos, indicando que la metodología MGD no reduce apreciablemente su precisión en presencia de individuos emparentados. Además, los resultados obtenidos con 100 y 200 SNPs y cinco subpoblaciones fueron muy similares a los anteriores (datos no mostrados).

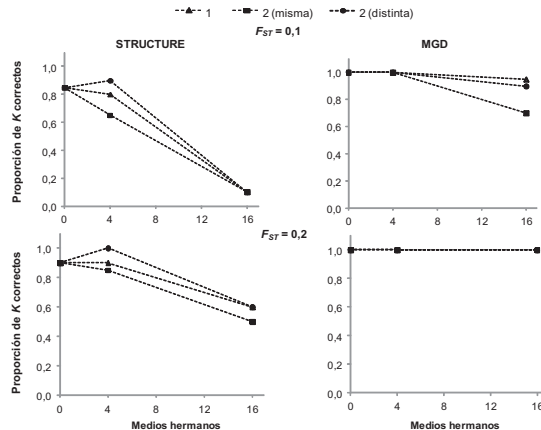


Figura 2. Proporción de réplicas en las que el STRUCTURE (columna izquierda) y MGD (columna derecha) inferen $K = 3$ cuando $n = 3$ en el caso de medios hermanos y distintos niveles de diferenciación. Las líneas discontinuas indican 10 microsatélites. Los triángulos representan una familia, los cuadrados indican dos familias en la misma subpoblación, y los círculos representan dos familias en subpoblaciones diferentes.

En resumen, los resultados indican que una metodología que no asume ni equilibrio de Hardy-Weinberg ni de ligamiento es más precisa a la hora de inferir estructura genética poblacional en presencia de individuos emparentados que una aproximación Bayesiana que si los asume. Por tanto, si se sospecha de la existencia de individuos emparentados en una muestra, sería conveniente emplear una metodología del primer tipo a la hora de inferir estructura genética poblacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, E.C. & Dunham K.K. 2008. Mol. Ecol. Res. 8: 1219-1229.
- Corander, J., Waldmann, P., Martinen, P. & Sillanpaa, M.J. 2004. Bioinformatics 20: 2363-2369.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Mol. Ecol. 14: 2611-2620.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Genetics 155: 945-959.
- Rodríguez-Ramilo, S.T., Toro, M.A. & Fernández, J. 2009. Genet. Sel. Evol. 41: 49.
- Rodríguez-Ramilo, S.T. & Wang, J. 2012. Mol. Ecol. Res. 12: 873-884.

ADVANCES ON THE INFERENCE OF POPULATION GENETIC STRUCTURE IN PRESENCE OF RELATED INDIVIDUALS

ABSTRACT: This study aims to compare two methodologies for the inference of population genetic structure in presence of related individuals. The first method implements a Bayesian approach to minimise Hardy-Weinberg and linkage equilibrium within subpopulations. The second methodology maximises genetic distance between subpopulations and does not make Hardy-Weinberg and linkage equilibrium assumptions. Using simulated data, the results indicate that the second approach is less influenced by the presence of close relatives, and is more appropriated when close relatives are supposed to be present in a sample.

Keywords: population structure, related individuals, molecular markers.

Calidad de los productos

EFFECTO DE DIETAS ENRIQUECIDAS CON SEMILLA DE LINO Y CLA EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL DEPÓSITO SUBCUTÁNEO DE TERNEROS FRISONES

Gómez¹, I., Beriain¹, M.J., Mendizábal¹, J.A., Sarriés¹, M.V., Pau¹, V. Insausti¹, K., Albertí², P., Realini³, C.E. y Purroy¹, A.

¹ ETSIA. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona.

E-mail: inma.gomez@unavarra.es

² CITA de Aragón. Avda. Montañana, 930 50059 Zaragoza.

³ IRTA. Finca Camps i Armet, 17121 Monells.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los consumidores son conscientes de la relación existente entre dieta y salud, por lo que la tendencia en el sector cárnico es la mejora del perfil lipídico de la carne. En varios estudios se ha comprobado las propiedades saludables que presentan los ácidos grasos omega-3 α -linolénico (ALA), eicosapentanoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (McAfee et al., 2010; McNeill y Van Elswyk, 2012) y el ácido linoleico conjugado (CLA) (Rubino et al., 2008; Benjamin y Spener, 2009). Una de las estrategias para enriquecer el contenido de la carne con estos ácidos grasos saludables es aumentando la disponibilidad del contenido de los precursores de dichos ácidos grasos en la dieta animal. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la adición de lino y/o CLA en la dieta de terneros frisonos sobre el perfil de ácidos grasos en el depósito grasa subcutáneo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha determinado el perfil de ácidos grasos de 48 terneros frisonos. A partir de unos 150 kg de peso, los animales fueron alimentados con 4 dietas diferentes: control (0% lino, 0% CLA), lino (10% lino, 0% CLA), CLA (0% lino, 2% CLA) y lino+CLA (10% lino y 2% CLA). Las cuatro dietas eran isoproteicas (16,9% PB) e isoenergéticas (3,34 McalEMkg⁻¹) y se formularon con una suplementación de 110 mg de vitamina E/kg de pienso (Albertí et al., 2011). Los animales fueron sacrificados una vez que alcanzaron el peso aproximado de 450 kg (a los 12-13 meses de edad). A las 24 horas post sacrificio, se tomaron muestras del tejido subcutáneo a la altura de la 10^a vértebra torácica, para el análisis del contenido en ácidos grasos. Posteriormente, las muestras se congelaron a -20°C para su conservación hasta el momento del análisis. El método utilizado para la extracción y metilación de la grasa fue el descrito por Whittington et al. (1986), al que se le aplican las modificaciones de Aldai et al. (2005). El perfil de ácidos grasos se analizó mediante cromatografía de gases con el equipo GC 7890 con splitless inlet y detector FID con una columna de 120 m y helio como gas portador. Los ácidos grasos fueron expresados como porcentaje del total de ácidos grasos detectados (g/100g del total de ácidos grasos). El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza, considerando la dieta como factor fijo (SPSS 19.0). Para identificar diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$) se aplicó el test de Tukey. Además, se ha realizado un análisis factorial por el método de componentes principales para relacionar los ácidos grasos y diferenciar las muestras según la dieta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra los valores de los ácidos grasos más relevantes y el sumatorio de los diferentes grupos de ácidos grasos, en las muestras del depósito subcutáneo de los terneros alimentados con la dieta control, lino, CLA y lino+CLA. Se observó una tendencia ($p=0,07$) a la disminución del contenido de ácidos grasos saturados (AGS) al adicionar lino y/o CLA en la dieta de los animales. Igualmente, Mapiye et al. (2013) también obtuvieron contenidos menores de AGS en los novillos alimentados con lino. Por otra parte, no se encontraron diferencias ($p=0,56$) en la composición de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) en los 4 lotes estudiados. Asimismo, la adición de lino en los lotes lino y lino+CLA dio lugar a un mayor contenido en el C18:3n3 (figura 2.a), debido probablemente al alto contenido de C18:3n3 procedente de la dieta, encontrándose los contenidos mayores de los sumatorios de n3, n6 y ácidos grasos poliinsaturados (AGP) en los lotes lino y lino+CLA ($p < 0,001$). La

carne procedente del lote lino+CLA presentó unos contenidos mayores en CLA9c11t y C18:1t11 (ácido transvaccénico, TVA) ($p < 0,001$) que está relacionado con el alto contenido de C18:2n6 y C18:3n3 procedente de la dieta, resultados que concuerdan con los hallados por Warren et al. (2008) en frisonos alimentados con dietas enriquecidas en n6 y n3. Cuando se realizó el análisis factorial de componentes principales, la distribución de las muestras indicó la existencia de dos grupos: la carne procedente de los lotes control y CLA y aquella de los lotes lino y lino+CLA (figura 1). Los resultados fueron los esperados, puesto que, en general, los animales alimentados con las dietas lino y lino+CLA tuvieron los mayores contenidos del ácido graso C18:3n3 y CLA9c11t. Cabe destacar que el ratio n6/n3 en los lotes lino y lino+CLA (4,09 y 3,71) se redujo a la sexta parte respecto al control (24,06), alcanzando los niveles recomendados nutricionalmente (en torno a 4 según la WHO, 2003). Sin embargo, en el lote CLA el ratio n6/n3 se mantuvo elevado (21,52). Además, los lotes lino y lino+CLA tuvieron una relación AGP/AGS 2 veces mayor que la de los lotes control y CLA. En un trabajo previo, Sarriés et al. (2011) determinaron el perfil lipídico del depósito intramuscular (IM) en estos mismos animales. Si se comparan ambos depósitos (SC e IM), se puede apreciar como el ácido graso C18:3n3 en los lotes lino y lino+CLA aumentó 7 veces respecto al control en el depósito IM y 8 en el SC debido a la adición de lino en la dieta, siendo el contenido del ALA del lote CLA similar al lote control en ambos depósitos (figura 2.a). Por otro lado, los ratios n6/n3 obtenidos en ambos depósitos fueron del mismo orden (figura 2.b), mientras que la relación AGP/AGS del depósito IM fue aproximadamente 3 veces superior que la del depósito SC (figura 2.c). En conclusión, la adición conjunta de semillas de lino y CLA en las dietas de los terneros frisonos ha supuesto un mayor contenido en AGP, un mayor contenido de CLA y un menor ratio n6/n3 consecuencia de los mayores contenidos en n6 y n3, mejorando así el perfil lipídico de la grasa subcutánea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertí, P., Ripoll, G., Panea, B., Barahona, M., Beriain, M.J., Sarriés, V. & Realini C.E. 2011. ITEA, II:577-579.
- Aldai, N., Murray, B.E., Nájera, A.I., Troy, D.J. & Osoro, K. 2005. J.Sci.Food.Agr. 85: 1073-1083.
- Benjamin, S. & Spener, F. 2009. Nutr.Metab. 6:36.
- Mapiye, C., Turner, T.D., Rolland, D.C., Basarab, J.A., Baron, V.S., McAllister, T.A., Block, H.C., Uttaro, B., Aalhus, J.L. & Dugan, M.E.R. 2013. Livest. Sci. 151: 11–20.
- McAfee, A.J., McSorley, E.M., Cuskelly, G.J., Moss, B.W., Wallace, J.M.W., Bonham, M.P., Fearon A.M. 2010. Meat Sci. 84: 1–13.
- McNeill, S. & Van Elswyk, M.E. 2012. Meat Sci. 92: 166–173.
- Sarriés, M.V., Mendizábal, J.A., Beriain, M. J., Insausti, K., Gómez, I., Sanz, M., Albertí, P., Purroy, A. 2011. ITEA, II:580-582.
- Warren, H.E., Scollan, N.D., Enser, M., Hughes, S.I., Richardson, R.I., Wood, J.D. 2008. Meat Sci. 78: 256-269.
- Whittington, F.M., Prescott, N.J., Wood, J.D. & Enser, M. 1986. J. Sci. Food Agr. 37(8): 753-761.
- WHO (2003) Report of a joint WHO/FAO expert consultation, WHO technical report series 916, Geneva.

Agradecimientos: Proyecto financiado por INIA RTA2009-00004-CO2.

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos (g/100g del total de ácidos grasos) saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), en las muestras del depósito subcutáneo.

Ácido graso / Dieta	control	lino	CLA	lino+CLA	SEM	P
C18:1t11	3,51 ^a	3,83 ^a	4,08 ^a	5,90 ^b	0,372	<0,001
CLA9c11t	0,18 ^a	0,36 ^b	0,36 ^b	0,58 ^c	0,029	<0,001
ΣAGS	52,83	49,39	51,62	50,12	0,976	0,073
ΣAGM	44,40	46,33	45,27	45,03	0,960	0,557
ΣAGP	2,77 ^a	4,29 ^b	3,11 ^a	4,84 ^b	0,161	<0,001
Σn6	2,42 ^a	3,05 ^b	2,54 ^a	3,19 ^b	0,101	<0,001
Σn3	0,10 ^a	0,79 ^b	0,12 ^a	0,90 ^b	0,051	<0,001
ΣCLA	0,33 ^a	0,56 ^b	0,59 ^b	0,87 ^c	0,034	<0,001

Comparación entre dietas: Letras diferentes $p < 0,05$, Letras iguales o ausencia de letras $p > 0,05$

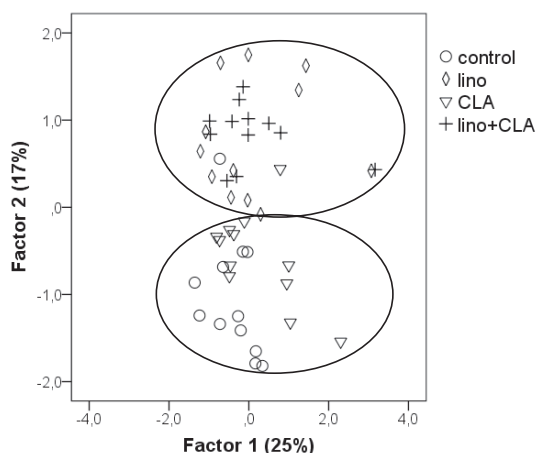


Figura 1. Análisis factorial de los ácidos grasos de las muestras de carne procedente de los animales alimentados con las dietas control (0% lino, 0% CLA), lino (10% lino, 0% CLA), CLA (0% lino, 2% CLA) y lino+CLA (10% lino y 2% CLA).

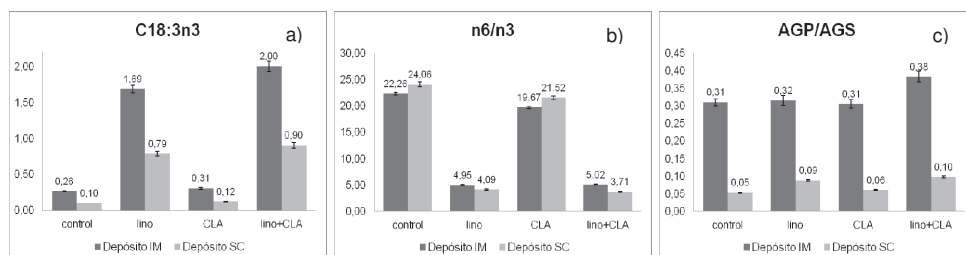


Figura 2. Relaciones n6/n3 y AGP/AGS, así como contenido del ácido graso C18:3n3 (medias \pm error típico) para los depósitos SC e IM de las muestras de carne de los animales alimentados con las dietas control (0% lino, 0% CLA), lino (10% lino, 0% CLA), CLA (0% lino, 2% CLA) y lino+CLA (10% lino y 2% CLA).

EFFECT OF LINSEED AND CLA ENRICHED DIETS ON THE FATTY ACID PROFILE OF SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE FROM HOLSTEIN BEEF

ABSTRACT: The aim of this research was to evaluate the effect of whole linseed and conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on the fatty acid profile of subcutaneous adipose tissue from Holstein beef. Forty-eight young Holstein bulls (slaughtered at 458.6 ± 9.79 kg body weight) were fed one of four isoenergetic and isoproteic diets: control (0 % linseed, 0 % CLA), linseed (10 % linseed, 0 % CLA), CLA (0 % linseed, 2 % CLA), and linseed plus CLA (10 % linseed, 2 % CLA). Subcutaneous fat samples were taken after 24 hours slaughter, from the 10th rib. The inclusion of linseed in the diet led to increase the level the linolenic acid, decrease the ratio of n6/n3 (linseed=4.09; linseed+CLA=3.71) and increase the ratio PUFA/SFA twice (linseed=0.09; linseed+CLA=0.10) in subcutaneous adipose tissue. Moreover, the addition of CLA in the diet decreased the ratio of n6/n3 (CLA=21.52), but linolenic acid and the ratio PUFA/SFA didn't show significative differences ($p > 0.05$) compared to the control. The nutritional quality of beef meat is improved by the inclusion of linseed and/or CLA in the diet of young bulls, due to the increase in total PUFA and total CLA and the decrease in n-6/n-3 ratio.

Keywords: beef, fatty acids, CLA, linolenic.

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE SEMILLA DE LINO Y CLA EN LA DIETA SOBRE LA ACEPTABILIDAD DE LA CARNE DE VACUNO.

Barahona, M.¹, Campo, M.M.¹, Olleta, J.L.¹, Sañudo, C.¹, Albertí, P.² y Realini, C.E.³
¹Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza.

E-mail: martabm@unizar.es

²CITA de Aragón. Avenida de Montañana, 930, 50059 Zaragoza.

³IRTA. Finca Camps i Armet, 17121 Monells.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha crecido el interés de los consumidores por la relación entre nutrición y salud, de ahí la mayor demanda de alimentos saludables, nutritivos y de los conocidos como alimentos funcionales. En España, el sistema de engorde de ganado vacuno se caracteriza por dietas con un alto contenido en concentrado y bajo en forrajes, lo que produce una carne con una composición de ácidos grasos (AG) saturados y *n*-6 elevada. Un bajo cociente AG poliinsaturados/AG saturados y un cociente *n*-6/*n*-3 elevado está asociado con el aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, que son la principal causa de mortalidad en los países desarrollados (Ganji *et al.*, 2003). Existe la posibilidad de enriquecer el contenido de la carne con AG *n*-3 y ácido linoleico conjugado (CLA) a través de la suplementación en la dieta con semilla de lino (fuente de *n*-3) y CLA protegido (fuente directa de CLA). La inclusión de alimentos ricos en estos ácidos grasos en la dieta de los rumiantes tiene un efecto positivo en la composición de la grasa en relación con la salud humana (Campo *et al.* 2006). Sin embargo, los ácidos grasos están involucrados en varios aspectos de la calidad, y la variación en la composición de la grasa puede provocar modificaciones en las características sensoriales de la carne, como la jugosidad y la terneza (Thomson, 2004). El objetivo del presente estudio ha sido observar el efecto que el enriquecimiento con semilla de lino y CLA protegido tiene sobre la aceptabilidad de la carne de vacuno por parte de los consumidores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 48 machos Frisones, distribuidos en cuatro lotes de alimentación: control, lino (10% de semilla de lino), CLA (2% de CLA protegido) y lino + CLA (10% de semilla de lino y 2% de CLA protegido). Los cuatro piensos se formularon isoproteicos e isoenergéticos. Los animales se sacrificaron cuando alcanzaron los 450 kg de peso vivo. A las 24 horas post-mortem, se extrajo el músculo *Longissimus dorsi* de la media canal izquierda y se cortaron filetes de 2 cm de grosor desde la 10ª costilla torácica. Cada muestra se envasó al vacío, se maduró durante 7 o 21 días y posteriormente se congeló a -18º C, hasta su análisis. El estudio de consumidores se llevó a cabo en Zaragoza con 240 personas de entre 18 y 75 años y equilibrados entre hombres y mujeres (46,3 y 53,8 %, respectivamente). Las muestras se descongelaron a 2±2º C durante 24 horas. Se cocinaron en un grill de doble placa a 200º C, hasta que la temperatura interna del filete alcanzó los 70º C. Los filetes fueron cortados en cubos de 2x2x2 cm, envueltos en papel de aluminio, codificados con un número aleatorio de 3 dígitos y mantenidos a una temperatura de entre 45º C y 55º C hasta el momento de su análisis.

Cada consumidor evaluó la aceptabilidad de la terneza, el sabor, la jugosidad y la aceptabilidad general de ocho muestras (4 dietas x 2 tiempos de maduración) mediante una escala hedónica del 1 al 9, donde 1 era "me disgusta extremadamente" y 9 "me gusta extremadamente". Para el estudio estadístico, se utilizó un análisis de varianza con un GLM, con la dieta y la maduración como efectos fijos (SPSS) y consumidor como variable. También se realizó un análisis de cluster (XLSTAT) para descubrir posibles nichos de consumidores que manifesten preferencias diferentes al conjunto de la población. Para valorar las diferencias, entre medias se utilizó un test Duncan dentro de cada interacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de la dieta fue significativamente diferente para todos los atributos estudiados, pero la maduración, que fue más significativa, no afectó a la aceptabilidad del sabor. Observando

las medias obtenidas para cada dieta, se ve que la carne procedente de aquellos animales que se alimentaron con semilla de lino fue la mejor valorada. Excepto para el sabor, que fue igual valorado que en la carne de animales cuyo pienso fue enriquecido con CLA, para la terneza, la jugosidad y la aceptabilidad general, la dieta de semilla de lino se diferenció significativamente del resto, no encontrándose apenas diferencias entre el resto de dietas. Estos datos coinciden con los obtenidos en el análisis sensorial con panel entrenado, donde también fue la carne enriquecida con semilla de lino, la más tierna y jugosa (Barahona *et al.*, 2011).

Como ya se ha comentado, la maduración ejerció un claro efecto sobre las variables estudiadas, observándose que la carne con un tiempo de maduración de 21 días es preferida por los consumidores, frente a la madurada durante 7 días. En el caso de la aceptabilidad de la terneza, esta diferencia fue más acentuada que para el resto de atributos donde la maduración fue significativa.

Puesto que aparecieron muchas diferencias significativas, se hizo un análisis de clústeres para encontrar nichos de consumidores significativamente distintos (Tabla 2). Se obtuvieron 4 grupos, que se diferenciaron por la influencia de la dieta y la maduración sobre el atributo de la aceptabilidad general. Existió una mayor influencia de la dieta que de la maduración, puesto que para los 4 clústeres se encontraron diferencias significativas, y además hubo una fuerte interacción entre ambos efectos. Se observó que había tres clústeres que prefirieron la carne de los animales a los que se les dio la combinación de lino y CLA sometida a maduraciones mayores. El clúster 3 (17,9% consumidores) valoró mejor las dietas con mayor maduración, a excepción de la de lino+CLA, que la prefirieron con una maduración más corta. La carne de los animales a los que sólo se les enriqueció la dieta con lino resultó mejor aceptada con 21 días de maduración para los clústeres 2 y 3 (37,1%), aunque los clústeres 1 y 4 la prefirieron con maduraciones más cortas. La carne enriquecida con CLA fue la que presentó menor diferencia entre maduraciones, siendo mejor aceptada por todos los clústeres a los 21 días de maduración, excepto para el clúster 1, en el que sucedió lo contrario.

Existió una fuerte influencia de la dieta en cuanto a la aceptabilidad de los consumidores, siendo la carne de las (dietas) enriquecidas con lino la mejor aceptada. Sin embargo, existieron diferentes grupos de población, que según el tiempo de maduración tendrán preferencias muy diferentes para las carnes enriquecidas con ácidos grasos insaturados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ganji, S.H. et al., 2003. J. Nutr. Biochem., 14, 298-305. • Campo, M.M. et al., 2006. Meat Sci., 72, 303-311 • Thomson, J.M. 2004. Austr. J. Exp. Agric. 44, 645-652. • Barahona, M. et al., 2011. 57th ICoMST pp. 583-585.

Agradecimientos. Al INIA por la financiación (INIA RTA2009-00004).

EFFECT OF WHOLE LINSEED AND PROTECTED CLA ENRICHED DIET ON BEEF CONSUMER ACCEPTABILITY

ABSTRACT. *Longissimus* steaks aged for 7 and 21 days from 48 Friesian males finished on 4 diets: (control, whole linseed: 10% linseed, CLA: 2% protected CLA, and whole linseed + CLA: 10% linseed and 2% protected CLA) were used to evaluate consumer acceptability. Two hundred and forty consumers participated in the study. Longer ageing times and the addition of 10% of linseed in the diet increased consumers' sensory acceptability of beef. When a cluster analysis is carried out, the preferences of beef from enriched diets depending on the ageing time.

Keywords: linseed, CLA, acceptability, consumer

Tabla 1. Valores medios, desviación estándar, valor F y significación del efecto de la dieta y la maduración sobre la aceptabilidad de la carne de vacuno.

	Control	Lino	CLA	Lino + CLA	7 días	21 días	Dieta	Maduración
Termeza	5.83 ± 2.00b	6.40 ± 1.81a	6.03 ± 2.02b	5.98 ± 2.09b	5.79 ± 2.09b	6.33 ± 1.84a	7.31***	36.89***
Jugosidad	5.73 ± 1.80c	6.24 ± 1.70a	6.01 ± 1.82b	5.81 ± 1.88bc	5.76 ± 1.91b	6.14 ± 1.68a	7.79***	21.38***
Sabor	6.13 ± 1.68b	6.39 ± 1.65a	6.36 ± 1.68a	6.06 ± 1.78b	6.18 ± 1.72	6.29 ± 1.69	4.37***	ns
Acep.general	5.98 ± 1.73b	6.48 ± 1.58a	6.20 ± 1.74b	6.03 ± 1.85b	6.03 ± 1.78b	6.31 ± 1.68a	8.21***	12.05***

ns: no significativo; †: $p \leq 0.1$; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$. a, b: diferentes letras implican diferencias significativas $p \leq 0.05$. La significación de la interacción Dieta x Maduración no aparece por ser no significativa para todas de las variables estudiadas.

Tabla 2. Valores medios, desviación estándar, valor F y significación del efecto de la dieta y la maduración sobre la aceptabilidad de los consumidores de la carne de vacuno (n=240).

Clúster (%)	Dieta				Maduración				
	Control	Lino	CLA	Lino+CLA	7d	21d	Dieta	Maduración	
1	25.8	5.65 ± 1.79c	6.22 ± 1.55b	6.75 ± 1.34a	5.93 ± 1.84bc	5.91 ± 1.79b	6.36 ± 1.55a	11.88***	24.82***
2	19.2	5.71 ± 1.61c	6.36 ± 1.69b	7.11 ± 1.25a	6.87 ± 1.50a	6.28 ± 1.66b	6.74 ± 1.52a	17.09***	9.24**
3	17.9	6.73 ± 1.53a	6.65 ± 1.64a	6.02 ± 1.72b	5.80 ± 1.93b	6.31 ± 1.69	6.29 ± 1.81	6.89***	ns
4	36.3	6.02 ± 1.65a	6.65 ± 1.46b	5.47 ± 1.82c	5.79 ± 1.86bc	5.89 ± 1.83	6.07 ± 1.68	15.16***	ns

ns: no significativo; †: $p \leq 0.1$; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$. a, b: diferentes letras implican diferencias significativas $p \leq 0.05$.

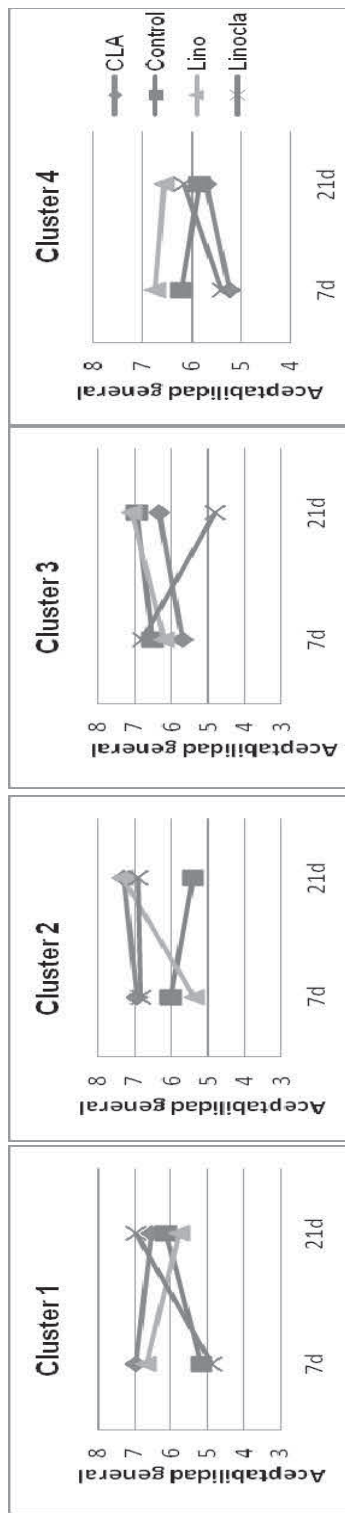


Figura 1. Evolución de la aceptabilidad general según la maduración para los 4 clusters encontrados entre la población del estudio.

INFLUENCIA DE LA EDAD DE CASTRACIÓN Y DEL NIVEL DE PROTEÍNA DE LA DIETA DE LA DIETA Y RELACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIMITANTES EN DICHA DIETA, SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE DE TERNEROS FRISONES.

Sañudo, C.¹, Muela, E.¹, Campo, M.M.¹, Valero, M.V.², Resconi, V.¹, Monge, P.¹, Fugita, C.A.², Catalán, O.³ y Prado, I.N.²

csanudo@unizar.es

¹ Producción Animal, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, España.

² Ciencia Animal, Universidad Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

³ Industrial Zootécnica Aragonesa, Poeta Luís Cernuda sn, 50018 Zaragoza, España.

INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios de mercado de organismos internacionales demuestran que tanto la producción como el consumo y el negocio de carnes rojas en el mundo mantendrán una tendencia creciente en las próximas décadas. Para el consumidor actual ya no basta con afirmar que un producto goza de un determinado atributo, sino que hay que poder demostrarlo científicamente, más aún en el caso de la carne, donde existe una imagen negativa de la misma asociada a sus efectos sobre la salud humana. Para contrarrestar esta imagen negativa, las ventajas del consumo de carne deben ser abordadas con un enfoque global, en donde su composición química juega un papel fundamental.

La castración es un factor que puede mejorar la calidad del producto (Purchas *et al.*, 2002; Mach, *et al.*, 2009), lo mismo que una dieta adecuada en proteína y aminoácidos que podría, igualmente, influir en la productividad y rentabilidad (Webb y O'Neill, 2008; Rotta *et al.*, 2009) y en la eliminación de contaminantes ambientales durante el proceso de cebo. El objetivo de este proyecto ha sido analizar el efecto que la edad de castración y los niveles de proteína y de aminoácidos en la dieta medidos como relación lisina/metionina tienen sobre la composición química de la carne en terneros frisonos.

MATERIAL Y METODOS

En el trabajo se utilizaron 64 machos frisonos, en un diseño de 8 tratamientos (2x2x2), con 8 individuos en cada uno de ellos. Los tratamientos fueron: Nivel de proteína bruta (13 y 15%); Relación lisina/ metionina (3,0 y 3,4) variando la metionina; Edad de castración (20 días y 150 días). Cuando los animales llegaron al peso de sacrificio (414,6 ± 38,6 kg) se trasladaron al matadero. A las 24 horas *post mortem* se separó el m. *Longissimus dorsi thoracis* (LT) izquierdo, que se troceó a las 48 horas en filetes de 2 cm. Las muestras fueron picadas, homogenizadas y analizadas (análisis químico) por duplicado (ISO R-1442, 1997; ISO R-936, 1998; ISO R-937, 1978 y ISO 1443, 1973). Para la composición en ácidos grasos, se extrajo la grasa por el método descrito por Bligh y Dyer (1959), con una posterior metilación y determinación del perfil en ácidos grasos por cromatografía de gases con un cromatógrafo HP6890. Se realizó un análisis de varianza multivariante, considerando los tres efectos considerados: nivel de proteína, relación lisina / metionina y edad de castración, así como las respectivas interacciones. Las diferencias entre medias se analizaron con un test de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nivel de proteína afectó ($P<0,05$) los porcentajes de proteína y de cenizas (Tabla 1), donde un mayor nivel de proteína en la dieta implicó un menor porcentaje de ésta en el músculo (<1%) y mayor cantidad de cenizas (<0.03%) (Tabla 2). La relación lisina/metionina tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de proteína ($P<0,05$), aunque difirió en menos de un 1%, observándose un mayor porcentaje de proteína en los animales alimentados con mayor relación de lisina/metionina. La castración afectó ($P<0,05$) al porcentaje de humedad, siendo los animales de castración tardía los que mostraron un mayor porcentaje de humedad en el LT. Igualmente se detectaron diversas interacciones entre los efectos estudiados.

Sobre la composición en ácidos grasos detectados se observa cómo la castración fue el efecto que, globalmente, presentó mayores efectos, aunque, en general, se puede decir que ninguno de los tres efectos principales analizados en este trabajo mostró una importancia reseñable sobre la composición de la grasa intramuscular (datos no mostrados). Así, el nivel de proteína fue significativo ($P < 0,05$) sobre la composición de los ácidos grasos monoinsaturados, presentando un porcentaje más elevado los animales que consumieron la dieta con mayor cantidad de proteína (44,46% vs. 43,10%). La relación lisina/metionina afectó ($P < 0,05$) exclusivamente a los ácidos grasos saturados, teniendo las dietas con relaciones más elevadas menores porcentajes de ácidos grasos saturados (47,44% vs. 48,49%) y, por ello, presumiblemente, carnes algo más saludables. La edad de castración fue significativa ($P < 0,01$) sobre la relación entre los ácidos grasos $n-6/n-3$, presentando los animales de castración más tardía una relación media más elevada que los de castración temprana (11,41 vs. 10,45) y por ello, en principio, una carne menos saludable. No hubo interacciones significativas entre los diferentes efectos estudiados.

En las condiciones en las que se realizó este estudio, se podría concluir que para conseguir carne con una composición química (básica y ácidos grasos) más favorable para el consumidor es recomendable incluir dietas con una mayor relación lisina/metionina reduciendo el contenido en metionina, y realizar una castración temprana

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. 1959.. Canadian Journal of Biochem. Phys. 37:911–914. ISO. 1973. Meat and meat products – fat. ISO 1443:1973. ISO, Geneva, Switzerland.
- ISO. 1978. Meat and meat products – nitrogen. ISO 937:1978. ISO, Geneva, Switzerland.
- ISO. 1997. Meat and meat products – moisture. ISO 1442:1997. ISO, Geneva, Switzerland.
- ISO. 1998. Meat and meat products – total ash. ISO 936:1998. ISO, Geneva, Switzerland
- Mach, N., Bach, A. Realini, C. E., Font i Furnols, M., Velarde, A. y Devant, M. 2009. Meat Sci. 81: 329–334.
- Purchas, R. W., Burnham, D. L. y Morris, S. T. 2002. J. Anim. Sci. 80: 3211–3221.
- Rotta, P. P., Prado, R. M., Prado, I. N., Valero, M. V., Visentainer, J. V. y Silva, R. R. (2009). Asian-Austr. J. Anim. Sci. 22: 1718-1734.
- Webb, E. C. y O'Neill, H.A. 2008. Meat Sci. 80: 28-36.

Agradecimientos: A Agrícola Mas Jonquer y al CDTI por la financiación (OTRI 2010/0568) y a Javier Heras y a los miembros de la Unidad de Producción Animal por su asistencia técnica.

EFFECT OF CASTRATION AGE, PROTEIN LEVEL AND LYSINE/METHIONINE RATIO IN THE DIET, ON MEAT COMPOSITION OF FRIESIAN STEERS INTENSIVELY REARED

ABSTRACT: The effect of castration age (15 days vs. 5 months), protein level (13 vs. 15%) and lysine/methionine (lys/met) ratio (3.0 vs. 3.4) in the diet on meat composition was studied in sixty four Friesian steers intensively reared. Castration age only affected muscle moisture and $n-6/n-3$ ratio, all of them higher in late castrated animals. High protein level produced meat with lower protein percentage and increased the percentage monounsaturated. High lys/met ratio produced meat with higher protein level and decreased the percentage of saturated fatty acids. Globally, it could be recommended diets with higher lysine/methionine ratios (3.4) by reducing the methionine content and early castration. In any case economical results, depending on the cost of the diet, should be considered.

Keywords: proximate composition, protein, fat, fatty acids.

Tabla 1. Valor de F y significación del nivel de proteína, la relación lisina / metionina en la dieta, la edad de la castración y sus respectivas interacciones en terneros frisones, sobre la composición química de la carne (%)

	Humedad	Grasa	Proteína	Cenizas
Nivel Proteína	NS	NS	**	*
Relación lisina/metionina	NS	NS	7,98*	6,69
Castración	* 5,42	NS	5,07	NS
Proteína x Relación	NS	*	NS	NS
Proteína x Castración	NS	5,85	*	NS
Relación x Castración	* 6,03	**	NS	NS
Proteína x Relación x Castración	* 7,11	7,80	NS	NS

NS: no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Tabla 2. Efecto del nivel de proteína, la relación lisina / metionina en la dieta y la edad de castración en terneros frisones, sobre la composición química de la carne (%).

Letras distintas dentro de la misma columna implican diferencias significativas.

Nivel Proteína	Relación lis / met	Castración	n	Humedad	Grasa	Proteína	Cenizas
13	alta	tardía	8	73,37ab	4,74b	22,04bc	1,03ab
		temprana	8	72,74bc	5,61b	22,01bc	1,02b
	baja	tardía	8	73,65a	5,22b	22,77a	1,04ab
		temprana	8	72,94abc	4,79b	22,21abc	1,02b
15	alta	tardía	8	73,32ab	4,43b	21,52c	1,07ab
		temprana	8	72,18c	4,73b	21,84bc	1,08a
	baja	8	72,70bc	6,86a	21,62bc	1,03ab	
		temprana	8	73,45ab	4,98b	22,26ab	1,05ab

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ADITIVOS EN LA DIETA SOBRE LOS PARAMETROS PRODUCTIVOS DE TERNEROS MESTIZOS

Fugita, C.A.¹, Prado, I.N.¹, Torrecilhas, J.A.¹, Sato, V.A.¹, Valero, M.V.¹, Ornaghi, M.G.¹, Cortez, R.A.¹, Guerrero, A.² y Sañudo C.²

¹Universidade Estadual de Maringá. Avda Colombo, 5790, Maringá – Brasil. betofugita@gmail.com, ²Facultad de Veterinaria de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177, 50.013, Zaragoza

INTRODUCCIÓN

Brasil es desde hace unos años uno de los principales países productores y exportadores de carne bovina a nivel mundial. Con un censo de 180 millones de cabezas de vacuno, las exportaciones brasileñas alcanzaron los 1,795 millones de toneladas de carne en el año de 2011 (ANUALPEC, 2012), lo que representa más del 24% de las exportaciones mundiales, siendo éstas distribuidas en diversos países de prácticamente todos los continentes. Respecto a la producción, cerca del 90% de los vacunos brasileños de aptitud cárnica son acabados en pasto. Sin embargo, la utilización de sistemas más intensivos proporciona desde una optimización del área utilizada, hasta una reducción de la edad de sacrificio y, por consiguiente, se logra mejorar las cualidades de la carne. Una alternativa para mejorar la eficiencia al alimentar animales estabulados es la utilización de aditivos. Debido a la prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación del ganado en Europa (Regulación, 2003) se está estimulando la búsqueda de otros productos que los puedan reemplazar. En este sentido, es necesario el estudio de los efectos de posibles sustituyentes naturales, que mejoren el sistema de producción de los animales en cebaderos, y que reduzcan las barreras de la carne brasileña para ser exportada hacia los países europeos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo fue desarrollado en la Universidad Estadual de Maringá (Maringá, Paraná, Brasil). Se utilizaron un total de 48 terneros mestizos (F1 – ½ Nelore vs ½ Angus) con 22 meses de edad y un peso medio de 318,23 ± 18 Kg. Durante el periodo de acabado, los terneros se estabularon en jaulas individuales durante un periodo de 94 días. La formulación de los piensos siguió las recomendaciones de NRC (2000) para ganancias de 1,5 kg/día. La dieta completa se ofrecía dos veces al día, a las 8h y 16h, estando esta constituida por un 50% de silo de maíz y un 50% de concentrado compuesto de germen de maíz, salvado de soya, sal mineral y caliza. Todas las dietas fueron isoenergéticas e isoproteicas, con 10,56% de proteína bruta y 70,3 de nutrientes digestibles totales.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en los distintos tratamientos con doce repeticiones. Los tratamientos utilizados fueron: Control, sin ningún aditivo añadido – CON, Aceites funcionales – OLI, Confimax – MAX y Levadura – LEV. En el tratamiento OLI se le añadieron 4 g/animal/día de aceites funcionales de semillas de ricino (50%) – *Ricinus communis* y de anacardo (50%)– *Anacardium occidentale*, al tratamiento MAX fueron añadido 10 g/animal/día de una mezcla de aceites de orégano– *Origanum vulgare*, ricino y de anacardo y levadura (CONFIMAX[®]) en la ración. En el tratamiento LEV fueron añadidos 5 g/animal/día de levadura viva – *Saccharomyces cerevisiae*.

En todas las dietas, se determinaron los valores de materia seca, materia orgánica, cenizas, proteína bruta y fibra neutro detergente de los alimentos ingeridos, determinaciones realizadas de acuerdo a las metodologías descritas por Silva & Queiroz (2002).

El alimento suministrado y las sobras fueron pesados diariamente para ajustar el consumo y evaluar la ingestión de materia seca y demás nutrientes. Semanalmente fueron colectadas muestras de alimentos y sobras. Los animales fueron pesados cada 21 días.

Al final del experimento, los terneros fueron sacrificados y las canales identificadas y pesadas para la obtención de peso de canal caliente (PCC).

Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza utilizando el programa SAS (2000). Para la comparación de las medias se utilizó el test de Tukey (P<5%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hubo diferencias significativas ($P < 0,01$) entre lotes respecto al peso vivo final (Tabla 1), siendo este mayor para los terneros del tratamiento MAX (485,5 Kg) que el tratamiento OLI que obtuvo un promedio de 456,9 kg, los tratamientos LEV (469,1 kg) y CON (464,3) obtuvieron unos valores intermedios entre ambos tratamientos. Los superiores pesos finales del tratamiento MAX demostrarían que la inclusión de un número mayor de aditivos en la dieta fue benéfica para la productividad.

Respecto al peso de la canal caliente, también se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$), obteniendo el tratamiento MAX los mayores valores y siendo estos similares a los tratamientos LEV y CON, mostrando el tratamiento OLI los valores más bajos, siendo estos resultados similares a los de los pesos finales. Sin embargo, el rendimiento canal no fue modificado ($P > 0,05$) por los diferentes aditivos en las dietas, presentando un promedio del 52%, valor acorde a los resultados de Prado *et al.* (2008), donde los valores de rendimiento de canales de vacunos mestizos terminados en cebaderos oscilaron alrededor del 50 al 54%.

En la ganancia media diaria de peso (Tabla 2) no se observaron diferencias ($P > 0,05$) entre los lotes, presentando un promedio de 1,60 Kg/día. Los demás parámetros productivos de ingestión materia seca, materia orgánica, materia mineral, proteína bruta, y de materia seca en relación al peso vivo, índice de conversión, ingestión de fibra neutro detergente e ingestión de fibra en relación al peso vivo, tampoco fueron afectados ($P > 0,05$) por la inclusión de los diferentes aditivos en la dieta.

La utilización de una mezcla de aditivos (Confimax) en la dieta de los terneros presentó resultados más significativos para la producción animal. Estos resultados pueden ser explicados en parte por la mayor cantidad de aditivos ofrecida y la posible interacción entre los mismos, contribuyendo para una mayor/mejor eficacia en la selección de la microbiota ruminal, pues los derivados del orégano tienen efectos antibacterianos (Ozkan *et al.*, 2003), el ricino y el anacardo tienen una acción antibacteriana actuando como ionóforos (Vieira *et al.*, 2001; Nagabhusha *et al.*, 1995) y la levadura una función en la reducción del oxígeno del rumen, proporcionando un aumento de las bacterias celulolíticas y también un probable aumento de la ingestión de materia seca (Wallace, 1994).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anualpec. Anuário estatístico da pecuária de corte. São Paulo: FNP Consultoria & comercio, 2012. •Nagabhusha K.S., Ash V.N., Obha; Ravindranath V. Selective ionophoric properties of anacardic acid. J. Nat. Prod., 58: 5, p.807-810, 1995. •National Research Council - NRC. Nutrient requirements of beef cattle. Washington, D.C.: National Academy Press, 2000. 158p. •Ozkan, G.; Sagdiç, O.; Ozcan, M. Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. Food Science Technology International. v. 9, n. 2, p. 0085-4, 2003. •Prado, I. N. *et al.* Carcass characteristics and chemical composition of the *Longissimus* muscle of crossbred bulls (*Bos taurus indicus* VS *Bos taurus taurus*) finished in feedlot. Journal of Animal and Feed Science, v.17, n.3, p.295-306, 2008. •Regulation C. 2003. Official Journal of the European Union L 268. •Sas Institute. 2000. SAS/STAT®. User's guide: statistics. Version 8.1. 4. ed., v.2, Cary: SAS Institute. •Silva, D.J. & Queiroz, S.A. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, p.23, 2002. •Vieira, C., Fetzer S., Sauer S.K. Pro and antiinflammatory actions of ricinoleic acid similarities and differences with capsaicin. Arch. Pharmacology, v. 364, p.87-95, 2001. •Wallace, R.J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. J. An. Sci., v.72, p.2992-3003, 1994.

Agradecimientos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq y Vet Science Nutracêuticos LTDA.

Tabla 1. Pesos y rendimiento canal de terneros mestizos terminados en cebadero y suplementados con diferentes aditivos.

Parámetros	Tratamientos				Media	SEM ⁵	P ⁶
	CON ¹	OLI ²	MAX ³	LEV ⁴			
n	12	12	12	12			
Peso inicial, kg	319,83	312,83	320,42	319,83	318,23	31,31	ns
Peso final, kg	464,33ab	456,90b	485,50a	469,10ab	468,96	24,09	**
PCC ⁷ , kg	244,55ab	238,95b	254,60a	247,95ab	246,51	13,82	**
RC ⁸ , %	52,70	52,34	52,46	52,82	52,58	1,46	ns

¹Tratamiento control, ²aceites funcionales, ³confimax, ⁴levadura, ⁵error estándar de la media, ⁶probabilidad, ⁷peso de canal caliente, ⁸rendimiento de canal. **Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en la misma fila son diferentes p<0,01.

Tabla 2. Parámetros productivos de terneros mestizos terminados en cebadero y suplementados con diferentes aditivos.

Parámetros	Tratamientos				Media	SEM ⁵	P ⁶
	CON ¹	OLI ²	MAX ³	LEV ⁴			
n	12	12	12	12			
Ganancia media día, kg	1,54b	1,53b	1,76a	1,59b	1,60	0,26	**
Ingestión de materia seca ⁷	7,78	8,25	8,99	8,81	8,46	1,81	ns
Ingestión de proteína bruta ⁷	0,82	0,87	0,95	0,93	0,89	0,19	ns
Ingestión de materia orgánica ⁷	7,58	8,03	8,75	8,57	8,23	1,76	ns
Ingestión de materia mineral ⁷	0,21	0,22	0,24	0,23	0,22	0,05	ns
IMS/PV, % ⁸	1,98	2,15	2,24	2,23	2,15	0,45	ns
CAMS, kg/GMD ⁹	5,16	5,64	5,14	5,65	5,40	1,50	ns
IFDN, kg/día ¹⁰	2,36	2,50	2,73	2,67	2,56	0,55	ns
IFDN/PV, % ¹¹	0,60	0,65	0,68	0,67	0,65	0,14	ns

¹Tratamiento control, ²aceites funcionales, ³confimax, ⁴levadura, ⁵error estándar de la media, ⁶probabilidad, ⁷en Kg/día, ⁸ingestión de materia seca en relación al peso vivo, ⁹conversión alimentaria, ¹⁰ingestión de fibra neutro detergente, ¹¹ingestión de fibra en detergente neutro en relación al peso vivo. **Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en la misma fila son diferentes p<0,01.

EFFECT OF THE ADDITIVES INCLUSION ON THE DIET ON PRODUCTIVE PARAMETERS OF CROSSBRED CATTLE

ABSTRACT: This experiment was carried out at State University of Maringá, Brazil. Forty eight crossbred bulls with 318 kg and 22 months old were used in the experiment, and remained in feedlot for 94 days. The diets were composed of 50% concentrate and 50% roughage. The treatments were completely randomized consisting of four treatments with different additives. It was determined that the final weight, hot carcass weight, carcass dressing, average daily gain, intake of dry matter, intake of dry matter in relation to body weight, crude protein intake, intake of organic matter, mineral matter intake and intake of fiber in neutral detergent. Means were compared by Tukey test at 5% significance using the SAS. The final weight was higher (P<0.01) to Confimax (485.5 kg) than in the group Funcional Oils (456.9 Kg), the group Control (464.3) and Yeast (469.1) were similar than the other groups, the hot carcass weight was higher (P<0.01) to bulls fed with Confimax (254.6 Kg) in relation with bulls fed with Funcional Oils (238.95 Kg). The average daily gain was higher (P<0.01) to Confimax (1.76 kg) than others groups, the group control with 1.54 Kg, Funcional Oils with 1.53 Kg and the Yeast group with 1.59Kg.

Keywords: *Anacardium occidentale*, levadura, *Origanum vulgare*, *Ricinus communis*

PROPOLEO Y ACEITES FUNCIONALES EN LA DIETA DE TERNEROS MESTIZOS (½ ANGUS VS. ½ ZEBU)

Valero, M.V.¹, Sañudo, C.², Zawadzki, F.¹, Campo, M.M.², Fugita, C.A.¹, Olleta, J.L.² y Prado, I. N.¹

¹Universidade Estadual de Maringá. Avda Colombo, 5790, Maringá – Brasil. maribelvelandia@hotmail.com, ²Facultad de Veterinaria de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177, 50.013, Zaragoza

INTRODUCCIÓN

En la producción de bovinos, se utilizan aditivos para mejorar la eficiencia alimentaria y maximizar el desempeño de animales estabulados. No obstante, las exigencias de los mercados de la Unión Europea, prohíben la producción o ingreso de alimentos de origen animal que contengan aditivos, como es el caso de los ionóforos.

En función a lo anterior, aditivos naturales han sido estudiados como substitutos de estos productos. El propóleo es una resina de diferentes partes de las plantas que las abejas colectan y mezclan con la saliva durante el transporte para almacenar y proteger la colmena. El propóleo es rico en flavonoides y tiene efecto antibiótico, antioxidante y anti-inflamatorio (Marcucci, 1995). Productos a base de propóleo han sido utilizados en la dieta de rumiantes y han mostrado efectos benéficos en la ganancia de peso diario y la eficiencia alimentaria (Zawadzki *et al.*, 2011). Sin embargo, es un producto heterogéneo y poco disponible.

Los aceites funcionales son compuestos naturales ricos en terpenoides lipofílicos extraídos de diferentes partes de las plantas y presentan actividad antimicrobiana modificando la estructura de la pared celular bacteriana y desnaturalizando y coagulando las proteínas (Benchaar *et al.*, 2008). Entre los aceites funcionales, los aceites de anacardo y ricino son usados para regularizar la fermentación ruminal y mejorar la eficiencia alimentaria en rumiantes alimentados con dietas de alto contenido en concentrado. Por otro lado, la glicerina es un subproducto del biodiesel que puede ser utilizada hasta el 15% en substitución al maíz en la dieta de rumiantes (Mach, *et al.*, 2009). Este trabajo fue realizado para evaluar el desempeño y digestibilidad de bovinos alimentados con dietas conteniendo glicerina en substitución al maíz, como fuente energética y el uso de aditivos naturales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este experimento fue aprobado por el departamento de producción animal de la Universidad Estadual de Maringá y realizado en la estación experimental de Iguatemi en el estado de Paraná, sur de Brasil. Se utilizaron 30 bovinos mestizos (½ Angus vs. ½ Nelore), en un diseño completamente al azar de 3 tratamientos y 10 repeticiones en cada uno de ellos. Los tratamientos fueron: CON – dieta normal sin aditivo; PRO- dieta normal más 35 g de propóleo/animal/día; AFU – dieta normal más 35 g de aceites funcionales de semillas de ricino – *Ricinus communis* y de anacardo – *Anacardium occidentale* (OLIGOBASICS®) animal/día. La composición porcentual y química de los alimentos y de la dieta experimental están presentadas en la Tabla 1 (NRC, 2000).

El alimento suministrado y las sobras fueron pesados diariamente para ajustar el consumo y evaluar la ingestión de materia seca y demás nutrientes. Semanalmente fueron colectadas muestras de alimentos y sobras. Los bovinos fueron alojados en corrales individuales. Para determinar la digestibilidad de la materia seca y otros nutrientes fueron colectadas muestras de heces durante los últimos 5 días y para estimar la producción fecal fue utilizado un indicador interno (materia seca indigestible). Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa SAS (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso final y la ganancia de peso diario fueron mejores para los animales de la dieta AFU, intermedio para la dieta PRO y menor para la dieta CON (Tabla 2). Los índices de transformación de la materia seca y de la proteína fueron mejores para los animales de la dieta AFU, no en tanto la dieta PRO no mostró diferencia frente a la dieta CON y AFU.

En cuanto a la ingestión de materia seca, proteína bruta, fibra en detergente neutro, fibra en detergente ácido, extracto etéreo, carbohidratos totales y nutrientes digestible totales no hubo diferencia entre las dietas (Tabla 2). La digestibilidad y los nutrientes digestibles de las

tres dietas fueron semejantes ($P>0,05$) como es observado en la Tabla 3. El mejor desempeño animal e índice de transformación de la materia seca y proteína bruta de los bovinos alimentados con las dietas PRO y AFU pueden ser explicados por la acción antimicrobiana de los propóleos (Prado, *et al.*, 2010) y aceites funcionales de las plantas (Benchaar *et al.*, 2008). Productos con actividad antimicrobiana actúan sobre la modulación ruminal, reducen la producción de metano y mejoran el desempeño y los índices de transformación alimentarios (Hart, *et al.*, 2008).

El uso de los aditivos propóleo y aceites funcionales de anacardo y ricino en la dieta de bovinos estabulados mejora la ganancia de peso diario, sin alterar el consumo y la digestibilidad. Del mismo modo, estos aceites funcionales mejoran el índice de transformación en bovinos de engorde.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). *An. Feed Sci. Tech.*, 145(1-4), 209-228. •Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., & Newbold, C. J. (2008). *An. Feed Sci. Tech.*, 147(1-3), 8-35. •Mach, N., Bach, A., & Devant, M. (2009). *J. An. Sci.*, 87(2), 632-638. •Marcucci, M. C. (1995). *Apidologie*, 26(2), 83-99. •NRC. (2000). *Nutrient Requirements of Beef Cattle: 7th ed.* Natl. Acad. Press, Washington, DC. •Prado, O. P. P., Zeoula, L. M., Moura, L. P. P., Franco, S. L., Paiva, S. B., & Arcuri, P. B. (2010). *Rev. Bras. Zootec.*, 39(9), 2048-2054. •SAS. (2004). *Institute Inc., SAS/STAT® 9.1 User's Guide.* SAS, Cary, NC. •Zawadzki, F., Prado, I. N., Marques, J. A., Zeoula, L. M., Rotta, P. P., Sestari, B. B., Valero, M. V., & Rivaroli, D. C. (2011). *J. An. Feed Sci.*, 20(1), 16-25.

PROPOLEO AND FUNCTIONAL OILS IN THE DIET OF CROSSBRED CATTLE (½ ANGUS VS. ½ ZEBU)

ABSTRACT: This study was conducted to evaluate the effect of the addition of propolis and functional oils in diets with glycerin on performance and digestibility in feedlot. Thirty crossbred bulls were used (½ Angus vs ½ Zebu) and distributed in three diets: Control, Propolis and Functional Oils. The average daily weight gain was better for animals ingesting PRO and AFU. The intake and digestibility of nutrients were not altered by the additives. Furthermore, transformation rates of dry matter and protein were better for animals with AFU diets.

Keywords: *Anacardium occidentale*, digestibility, *Ricinus communis*.

Tabla 1. Composición química de los alimentos.

Ingredientes	g/kg									
	MS ¹	MO ²	PB ³	Cenizas	NDT ⁴	EE ⁵	FDN ⁶	FDA ⁷	CT ⁸	CNF ⁹
Silo de maíz	266,2	964,5	72,7	35,4	620,0	18,2	524,0	316,5	873,7	349,6
Maíz molido	900,4	987,5	93,4	12,5	900,0	33,5	154,2	49,3	860,6	706,4
S. de Soja ¹⁰	896,5	941,7	488,9	58,3	820,0	30,0	106,6	103,3	422,8	316,2
Glicerina	942,2	10,0	1,00	47,6	807,4	60,0				
Urea	990,0		2620							
Sal mineral	990,0			1000						
Caliza	990,0			950,0						
Propóleo	146,0									
Aceites funcionales	976,2	559,4		440,4		150,0				
Dieta total	434,0	807,4	115,3	40,1	73,83	29,8	292,7	166,2	689,2	396,5

¹Materia seca, ²Materia orgánica, ³Proteína Bruta, ⁴Nutrientes digestible totales, ⁵Extrato etéreo, ⁶Fibra detergente neutro, ⁷Fibra detergente ácido, ⁸Carbohidratos totales, ⁹Carbohidratos no fibrosos, ¹⁰salvado de soja.

Tabla 2. Datos productivos de bovinos engordados en cebadero.

Item	Dietas			P<F	SEM ⁴
	CON ¹	PRO ²	AFU ³		
n	10	10	10		
Peso inicial, kg	381,60	385,30	393,60	0,74	6,28
Peso final, kg	457,30c	469,10b	484,03a	0,05	8,02
Ganancia de peso diario, kg	1,38c	1,52b	1,64a	0,05	0,06
Ingestión de materia seca, kg/día	9,72	9,90	10,43	0,67	0,33
Ingestión de materia seca, %/PV	2,31	2,30	2,39	0,82	0,06
Ingestión de materia orgánica, kg/día	9,34	9,51	10,02	0,67	0,31
Ingestión de proteína bruta, kg/día	1,15	1,17	1,24	0,64	0,04
Ingestión de extracto etéreo, kg/día	0,29	0,30	0,31	0,61	0,01
Ingestión de fibra detergente neutro, kg/día	2,65	2,75	2,88	0,67	0,10
Ingestión de fibra detergente neutro %/PV	0,63	0,64	0,66	0,83	0,02
Ingestión de fibra detergente ácido, kg/día	1,51	1,55	1,63	0,72	0,06
Ingestión de fibra detergente neutro %/PV	0,36	0,36	0,37	0,86	0,01
Ingestión de carbohidratos totales, kg/día	7,89	8,04	8,47	0,67	0,27
Ingestión de carbohidratos no fibrosos ⁶	5,24	5,29	5,59	0,67	0,17
Ingestión de nutrientes digestibles totales ⁶	7,17	7,31	7,70	0,67	0,24
Índice de transformación de materia seca ⁵	7,08b	6,50ab	6,40a	0,04	0,12
Índice de transformación de proteína bruta ⁵	0,84b	0,77ab	0,76a	0,03	0,01

¹Dieta control, ²Dieta con adición de propóleo, ³Dieta con adición de aceites funcionales, ⁴Error estándar de la media, ⁵Ingestión de materia seca/ganancia de peso diario (kg), ⁶Kg/día

Tabla 3. Digestibilidad aparente de bovinos engordados en cebadero (%).

Item	Dietas			P<F	SEM ⁴
	CON ¹	PRO ²	AFU ³		
n	10	10	10		
Materia seca	69,84	70,91	69,97	0,83	0,75
Materia orgánica	64,27	66,10	65,15	0,68	0,83
Proteína bruta	64,38	65,09	64,62	0,93	0,73
Extracto etéreo	75,53	78,48	77,11	0,52	1,03
Fibra en detergente neutro	48,34	49,42	48,25	0,86	0,95
Fibra en detergente ácido	44,58	46,32	44,60	0,68	0,91
Carbohidratos no fibrosos	81,45	81,95	81,53	0,83	0,35
Carbohidratos totales	65,49	67,25	66,27	0,73	0,89
Nutrientes digestibles totales	71,77	73,58	72,41	0,74	0,94

¹Dieta control, ²Dieta con adición de propóleo, ³Dieta con adición de aceites funcionales, ⁴Error estándar de la media.

PREVALENCIA DE OLOR SEXUAL EN CERDOS MACHOS ENTEROS ESPAÑOLES. RESULTADOS PRELIMINARES CON LA TÉCNICA “HUMAN NOSE”

Zammerini¹, D., Panella-Riera, N., Tarsitano, M.A., Borrissier, F., Olivares, A., Garrido, M.D., Martínez, B. y Oliver, M.A.

¹Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries, Monells, 17121.

Dario.zammerini@irta.cat

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales motivos de la castración en lechones es evitar la presencia de olor sexual o “boar taint” en la carne de machos enteros, que puede afectar a la aceptabilidad de la carne de cerdo por parte del consumidor (Desmoulin *et al.*, 1982; Diestre *et al.*, 1990; Matthews *et al.*, 2000; Bañón *et al.*, 2004). Sin embargo, hay un movimiento a nivel europeo que pretende regular/prohibir la castración de los lechones. Además, dentro y fuera de la Unión Europea ya se están aplicando algunas alternativas a la castración quirúrgica, como la cría de machos enteros o la inmunocastración. Según la Declaración de Bruselas (2010), existe un compromiso totalmente voluntario para que desde el 1 de enero 2012 la castración quirúrgica se haga con analgesia o anestesia prolongada y en una segunda etapa la castración quirúrgica se abandone completamente a partir del 1 de enero de 2018.

El olor sexual en la carne de cerdo se describe como un olor y un sabor desagradable, que hace referencia al olor de sudor, orina, cerdo y granja, que se hace especialmente intenso durante la cocción de la carne (Mathur *et al.*, 2012). Los compuestos responsables del olor sexual son principalmente la androsterona y el escatol (Matthews *et al.*, 2000).

El método sensorial *Human Nose*, en la actualidad, es el único que se está utilizando en condiciones comerciales para detectar el olor sexual en la canales de cerdos (Klont *et al.*, 2009). El método se basa en calentar la grasa subcutánea de las canales con una superficie metálica muy caliente de modo que, el panelista entrenado, pueda oler e identificar las canales que tengan los compuestos responsables del olor sexual acumulados en su grasa. Así, en esta comunicación se presentan, de modo preliminar, la incidencia de canales de machos enteros con olor sexual en diferentes comunidades autónomas (Cataluña, Murcia y Aragón) utilizando el método *Human Nose*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron 904 muestras de grasa en 5 comunidades autónomas (Aragón, Cataluña, Castilla y León, Madrid y Murcia), con un mínimo 180 muestras por comunidad autónoma. El objetivo fue obtener muestras de 6 granjas distintas, preferiblemente de animales sacrificados en 2 mataderos distintos, y siendo las canales seleccionadas aleatoriamente. Hasta el momento se clasificaron 423 muestras de 3 comunidades autónomas, siendo 90 muestras de Aragón, 150 de Cataluña y 183 de Murcia.

La grasa subcutánea se obtuvo de la región dorsal del cuello de las canales izquierdas de cerdos machos enteros. De cada canal muestreada se recogió el peso de la canal caliente (Kg) y el espesor de grasa a nivel de la última costilla (mm). Cada muestra recogida fue envasada al vacío, etiquetada y almacenada a -20°C, hasta la realización del análisis mediante la técnica sensorial del *Human Nose*.

La técnica sensorial del *Human Nose*, recientemente publicada (Mathur *et al.*, 2012), consiste en entrenar unos panelistas para que sean capaces de clasificar las canales según el nivel de olor sexual en la misma línea del sacrificio. En este estudio la clasificación no se realizó en la línea de sacrificio sino que se realizó a posteriori en una sala de catas del IRTA-Monells, por parte de unos panelistas entrenados. Para el entrenamiento de los panelistas, que siguió la metodología de Font i Furnols *et al.* (2000) modificada, se seleccionaron tres panelistas sensibles a la androstenona, que siguieron un programa de entrenamiento entre febrero y junio del 2012. Después del entrenamiento la escala de valoración fue definida por los mismos panelistas como: 0= sin olor sexual; 1= bajo olor sexual; 2= medio olor sexual y 3= alto olor sexual. Adicionalmente, y para desarrollar una herramienta de decisión a nivel de matadero con la técnica del *Human Nose*, se decidió combinar las puntuaciones individuales de los tres panelistas sumando la puntuación de cada uno de ellos:

Valoración global = Σ (Panelista1 + Panelista2 + Panelista3), siendo el valor mínimo cero (0) y máximo nueve (9), ya que la puntuación mínima es cero y la máxima es 3 de la escala de evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media del peso de las canales que participaron en el estudio fue de $77,6 \pm 7,92$ kg. Por comunidades autónomas, el peso canal Aragón presentó una media de $82,1 \pm 8,80$ kg, Cataluña $77,5 \pm 6,86$ kg y Murcia $75,5 \pm 7,37$ kg. En cuanto al espesor de grasa, la media general de las canales utilizadas para el estudio fue de $17,9 \pm 5,21$ mm. Por comunidad autónoma Aragón, Cataluña y Murcia presentaron un espesor medio de $18,5 \pm 4,60$ mm, $16,6 \pm 3,96$ mm y $18,7 \pm 6,11$ respectivamente (Tabla 1).

La Figura 1a muestra la evaluación individual por panelistas según el método del Human Nose con soldador eléctrico. Cuando se observan los resultados de las 423 muestras analizadas para olor sexual por cada panelista, se aprecia que el mayor porcentaje de las muestras fueron clasificadas con nivel cero (0) de olor sexual variando entre 52,4% y 63,6%. Un porcentaje de las muestras entre 1,9% y 4,7% fueron clasificadas con nivel medio de olor sexual y ninguna muestra fue puntuada con nivel 3 (nivel más alto de olor sexual) (Figura 1a). La variabilidad encontrada en el porcentaje de las muestras clasificadas en un mismo nivel de olor sexual puede ser debida a los diferentes animales, diferencias existente entre la percepción del olor por cada panelista o diferencias en las actitudes de su puntuación (Mathur *et al.* 2012).

La figura 1b muestra la evaluación global de las 423 muestras, con la suma de la puntuación de los panelistas, siendo la puntuación mínima 0 y la máxima 9. Para simplificar la escala, se consideraron cuatro niveles distintos según el resultado de la suma de puntuaciones individuales de los panelistas: Categoría [0:1] (equivalente por los panelistas a una percepción sin olor sexual); Categoría [2:3:4] (bajo olor sexual); Categoría [5:6:7] (medio olor sexual) y Categoría [8:9] (alto olor sexual). Así, al sumar los puntos, el 63,1 % de las muestras fueron clasificadas en la categoría [0:1], sin olor sexual, el 34,5% en la categoría [2:3:4], nivel bajo de olor sexual, el 2,4% en la categoría [5:6:7], nivel medio de olor sexual que podría resultar problemático para los consumidores. Entre todas las muestras ninguna obtuvo una puntuación total de 8 y 9, equivalente por los panelistas a nivel alto de olor sexual (Figura 1b). En la tabla 2 se muestra el porcentaje de muestras de cada comunidad autónoma clasificadas por la suma de la puntuación de los 3 panelistas. La muestras clasificadas en la categoría [5:6:7], igual a un nivel medio de olor sexual que podría resultar problemático para los consumidores, para Aragón resultaron ser un 4,44% del total, para Cataluña el 2,67% y para Murcia el 1,10%, mientras las muestras clasificadas como sin olor sexual o categoría [0:1], que resultarían ser sin problemas por los consumidores, fueron para Aragón el 61,11% del total, en Cataluña el 65,33% de las canales y en Murcia el 62,29%.

Los resultados preliminares del presente estudio sugieren que la técnica del Human Nose podría ser utilizada para identificar canales con distintos niveles de olor sexual con panelistas entrenados. Los resultados indican que con la percepción de los panelistas, ninguna de las muestras fue clasificada con niveles extremos de olor sexual, pero el 2,4% presentó un nivel medio que podría resultar problemático por algunos consumidores. Aún así, es necesario correlacionar los resultados sensoriales con los valores químicos para establecer a partir de qué puntuación el consumidor rechazaría la grasa por sus niveles de olor sexual.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bañón, S. *et al.* (2004). Food Qual. Pref., 15, 293-300. • Desmoulin, B. *et al.* (1982). Liv. Prod. Sci., 9, 707-715. • Diestre, A. *et al.* (1990). Anim. Prod., 50, 519-530. • Font i Furnols, M. *et al.* (2000). J. Sensory Stud. 15, 393-409. • Klont, R.E. *et al.* (2009). ICOMST 2009. • Mattews, K.R. *et al.* (2000). Meat Sci. 54, 271-283. • Mathur, P.K. *et al.* (2012). Meat Sci. 91, 414-422.

Agradecimientos: Estudio financiado por INIA (proyecto RTA2011-00027-CO2-00). Beca concedida por CAPES – Proceso nº9273123.

Tabla 1. Peso y espesor de grasa de las canales seleccionadas para el análisis de Human Nose en función de las comunidades autónomas (CCAA)

	N animales	Peso Canal (Kg)				Espesor grasa (mm)				
		Media	D.E.	Mínimo	Máximo	Media	D.E.	Mínimo	Máximo	
Global	423	77,6	7,92	46,5	105,4	17,9	5,21	5,0	35,0	
CCAA	Aragón	90	82,1	8,80	57,0	105,4	18,5	4,60	8,0	30,0
	Cataluña	150	77,5	6,86	57,5	93,8	16,6	3,96	5,0	26,0
	Murcia	183	75,5	7,37	46,5	98,8	18,7	6,11	5,0	35,0

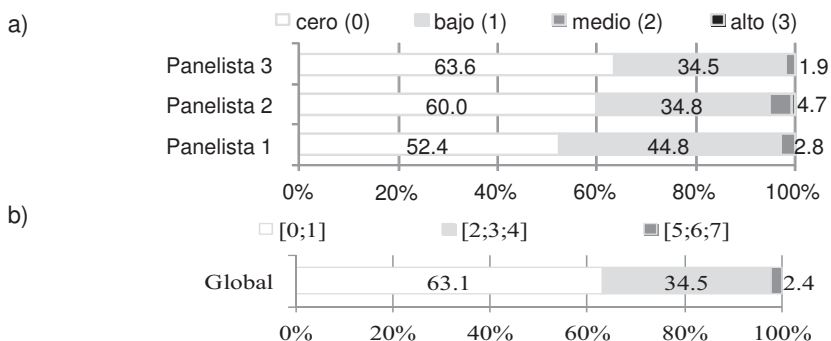


Figura 1. Evaluación de las 423 muestras por panelistas utilizando el método del Human nose con soldador eléctrico. a) Evaluación individual de los panelistas. b) Valoración global: Valoración global = \sum (Panelista₁₋₃); Categorías: [0:1] (la suma de los tres panelistas es 0 o 1); [2:3:4] (la suma de los tres panelistas es 2, 3 o 4); [5:6:7] (la suma de los tres panelistas es de 5, 6 o 7); [8:9] (la suma de los tres panelistas es de 8 o 9)

Tabla 2. Porcentaje de muestras clasificadas por comunidad autónoma (CCAA) de acuerdo con el nivel de olor sexual por la suma de los puntos de los tres panelistas

CCAA	Suma de la puntuación de los panelistas									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aragón (%)	22,22	38,89	17,78	15,56	1,11	2,22	2,22	0	0	0
Cataluña (%)	25,33	40,00	17,33	12,67	2,00	2,00	0,67	0	0	0
Murcia (%)	31,69	30,60	22,40	12,02	2,19	0,55	0,55	0	0	0

Valoración global = \sum (Panelista1 + Panelista2 + Panelista3).

BOAR TAINT PREVALENCE IN SPANISH ENTIRE MALE PIGS. PRELIMINARY RESULTS WITH THE TECHNIC "HUMAN NOSE"

ABSTRACT: The preliminary objective was to evaluate the prevalence of boar taint in commercial entire male pigs in different regions of Spain using the "Human Nose" methodology. To use this technique 3 panellists sensible to androstenona were selected and trained. The panellists defined a 4 point scale for the evaluation of boar taint: 0= no boar taint, 1 = low, 2= medium and 3 = high. Between the 52.4 and 63.6% of the samples were classified as level 0; between 1.9 and 4.7% as level 2, while only a panellist evaluate 1 of the samples as a level 3. To classify the 423 samples tested, a new group of categories were defined by the sum of the 3 panellists' punctuations, from 0 to 9. Like this the 63.1% of the samples were of category [0:1], none was of the highest category [8:9], but the 2.4% was classified in the category [5:6:7], i.e. medium boar taint. The preliminary results suggest that the "Human Nose" technique could be efficiently used to classified pork for boar taint levels. However, it is still necessary to correlate these results with the chemical levels of the compounds and define at which level the consumer would discard pork.

Keywords: boar taint, pig entire males, human nose.

INTEGRACIÓN DE SENSORES NIRS Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN Y DE LA COMUNICACIÓN COMO MOTOR DE INNOVACIÓN EN LA INDUSTRIA DEL CERDO IBÉRICO

Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., Pérez-Marín, D. y Guerrero-Ginel, J.E.

Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos, Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agroalimentaria y de Montes, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Campus Rabanales, km 396, N-IV, 14014, Córdoba, España. e-mail: e.zamora@uco.es

INTRODUCCIÓN

Trabajos de investigación realizados durante varios años por el Grupo de Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos (ISPA) de la Universidad de Córdoba han mostrado el potencial de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para el análisis – *at line* – (laboratorio) de grasa fundida y tejido adiposo intacto, y la posterior clasificación de canales de cerdo ibérico en diferentes categorías comerciales, de acuerdo con el régimen alimenticio de los animales. La subjetividad y alto coste de las inspecciones en campo, las conocidas variaciones individuales existentes en la composición en ácidos grasos del tejido adiposo de animales (De Pedro y García-Olmo, 1999) y el alto precio alcanzado en el mercado por las piezas curadas procedente de estos tipos de animales, hace deseable y necesario que los sistemas de control basados en la tecnología NIRS puedan aplicarse a cada animal de forma individual. Durante las Jornadas de AIDA de 2005, 2007 y 2009, se mostró cómo los avances en instrumentación NIRS abrían enormes expectativas para su uso *in situ/on-line* en la línea de procesado (De Pedro *et al.*, 2005 y 2007; García Molina *et al.*, 2009). El presente trabajo muestra el potencial de la integración de datos procedentes de equipos NIRS portátiles basados en sistemas micro-electromecánicos (MEMS), junto con otras tecnologías de la información y de la comunicación (TIC), para que usuarios no expertos puedan de forma simple, sencilla y rápida, analizar e interpretar los datos NIRS obtenidos, teniendo la información disponible al momento en dispositivos móviles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 110 canales de cerdos ibéricos producidos con diferentes regímenes alimenticios (Bellota, Recebo y Cebo) se analizaron en la línea de faenado durante dos campañas de sacrificio (2008/2009 y 2009/2010). De cada canal se registró el espectro por cuadruplicado del tejido adiposo (a unos 10 cm del área de inserción del rabo), utilizando un espectrofotómetro portátil MEMS-NIRS (Phazir™ 1624, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA). Este equipo realiza medidas en reflectancia (1600-2400 nm con un intervalo entre longitudes de onda no constante de aproximadamente 8 nm). La metodología seguida para el tratamiento previo al desarrollo de los modelos ha sido la propuesta por Shenk *et al.*, (2001) y qué, básicamente, consiste en la optimización del rango espectral de medida, el cálculo y minimización de errores espectrales, análisis de la estructura de las poblaciones espectrales y determinación e interpretación de muestras anómalas. Como pretratamiento de la señal espectral se utilizó *Standard Normal Variate* y *Detrending* (SNV+DT) seguido de una primera derivada basada en el algoritmo de Savitzky-Golay y centrado de los datos. Posteriormente, estos datos fueron utilizados para el desarrollo de modelos NIRS cuantitativos utilizando el algoritmo PLS (Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales), utilizándose como análisis de referencia el perfil de ácidos grasos determinado por cromatografía de gases. Se utilizó el paquete quimiométrico PLS Toolbox (ver 5.8, Eigenvector Research, Inc., USA) para MATLAB® (ver 7.10, The Mathworks, USA). En dicho entorno también se diseñó y desarrolló una interfaz gráfica de usuario (GUI, *Graphical User Interface*) para facilitar el análisis automático de los datos espectrales (repetibilidad espectral y predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos), obtenidos con el equipo portátil MEMS-NIRS. Asimismo, dicha GUI incluyó los modelos cualitativos desarrollados por Zamora-Rojas *et al.* (2012) para la predicción del régimen alimenticio de cerdo ibéricos

analizados *in situ* en la línea de faenado. El desarrollo de la aplicación android, para dispositivos móviles inteligentes, que permita la integración de información procedente de distintas fuentes como sensores NIRS y/o de campo se realizó con el software “App Inventor” del Massachuset Institute of Technology.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra las características de los modelos cuantitativos (predicción de ácidos grasos) desarrollados con un colectivo de calibración de 80 muestras y validados con un colectivo de 20 muestras. Asimismo, se presentan los modelos cualitativos (clasificación en regímenes de alimentación) publicados por Zamora-Rojas *et al.* (2012), ambos desarrollados con el mismo equipo portátil MEMS-NIRS. Estos resultados muestran el alto potencial que tienen estos nuevos equipos portátiles NIRS para un análisis fiable, rápido, multiparámetro e individual de canales de cerdo ibérico en la línea de faenado a un coste económico eficiente y sostenible. En base a esos resultados y a la experiencia previa acumulada, se ha diseñado un diagrama de flujo que recoge todas las etapas a programar para el desarrollo de la GUI; este diagrama permite el análisis automatizado de datos espectrales procedentes de equipos portátiles MEMS-NIRS. Normalmente los denominados sensores de bajo coste sólo incluyen software para la recogida de datos espectroscópicos, siendo necesario posteriormente exportarlos a otro software de tratamiento matemático-estadístico. Por tal razón, es necesario que la GUI incorpore distintas rutinas que permitan realizar todas las operaciones que se consideran críticas para la obtención de datos NIRS fiables, tales como importación de datos espectrales al nuevo entorno de trabajo de forma compatible y segura, optimización del rango espectral, evaluación de la repetibilidad espectral de las medidas y depuración de medidas anómalas, predicción cuantitativa y cualitativa de las muestras analizadas y obtención de estadísticos que informen sobre la fiabilidad de la predicción. El trabajo continuado con industrias del sector del cerdo ibérico nos ha mostrado la importancia de integrar la gran cantidad de información procedente de un sensor NIRS, incorporado “*on-line*” o *in situ*, con un sistema de apoyo a la toma de decisiones en la industria del cerdo Ibérico, de forma tal que los datos puedan estar fácilmente disponibles en diversas plataformas o bases de datos para integrarse con otro tipo de información relevante que permita tomar decisiones de una forma rápida y eficaz. La Figura 1 muestra el diseño final de la GUI desarrollada para el análisis automatizado de datos espectrales NIRS obtenidos con equipos MEMS-NIRS y la aplicación diseñada para android, la cual permite el registro y consulta web de bases de datos que integran información procedente del análisis NIRS individualizado de canales de cerdo Ibérico con otra procedente de otras fuentes. Todo esto pone de relieve el potencial de integrar sensores NIRS de última generación, para el control individual de canales de cerdo Ibérico, con otras tecnologías TIC, que facilitan la automatización del análisis de datos, su acceso remoto en cualquier ubicación y la toma de decisiones de una forma simple, rápida, intuitiva y eficiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De Pedro, E. y García-Olmo, J. (1999). Sólo Cerdo Ibérico 3, 89-94. De Pedro, E., Garrido, A., Núñez Sánchez, N., García Olmo, J., Aparicio Oliver, D., Campos León, M.I., Pérez Marín D., Fernández Cabanás, V.M. (2005). ITEA 26, 759-761. De Pedro, E., Garrido, A., Pérez Marín, D., Guerrero, J.E. y López López, A. (2007). ITEA 28, 630-632. García Molina, P., Garrido, A., De Pedro, E., Pérez-Marín, D., Guerrero, A. y López, A. (2009). ITEA 30, 541-543. Shenk, J.S., Workman, J.J. y Westerhaus, M.O. (2001). En D.A. Burns y E.W. Ciurczak (Eds.) Handbook of Near Infrared Analysis (Segunda edición), 348-383. CRC Press, Florida, USA. Zamora-Rojas, E., Pérez-Marín, D., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J.E. y Garrido-Varo, A. (2012). Meat Sci., 90, 636-642.

Agradecimientos: Eduardo Zamora-Rojas agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España la financiación recibida dentro del programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU). Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía nº P09-AGR-5129. Los autores agradecen la

colaboración de las empresas del sector del Ibérico: COVAP S.C.A., Ibérico de Bellota S.A. y a la Denominación de Origen Protegida Los Pedroches.

Tabla 1. Estadísticos de los modelos cuantitativos y cualitativos desarrollados con los datos espectrales de canales de cerdo ibéricos medidos in situ en la línea de matanza con un equipo MEMS-NIRS portátil.

Presentación de muestra	Rango / resolución (nm)	Número de muestras (Cal./Val.)	ETVC / ETP (%)				
			Palmítico (C16:0)	Estearico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)	
Tejido adiposo intacto (canal)	1.600-2.208 / ~8	80/20	0,84/1,00	0,60/0,68	1,47/1,30	0,52/0,55	
		Número de muestras (Cal./Val.)		Muestras clasificadas correctamente (%)*			
		Bellota	Cebo	Recebo	Bellota	Cebo	Recebo
		64/33	56/28	65/33	93,9	96,4	60,6

Cal: colectivo de calibración; Val: colectivo de validación; ETVC: error típico de validación cruzada; ETP: error típico de predicción. *Modelos publicados por Zamora-Rojas *et al.* (2012).

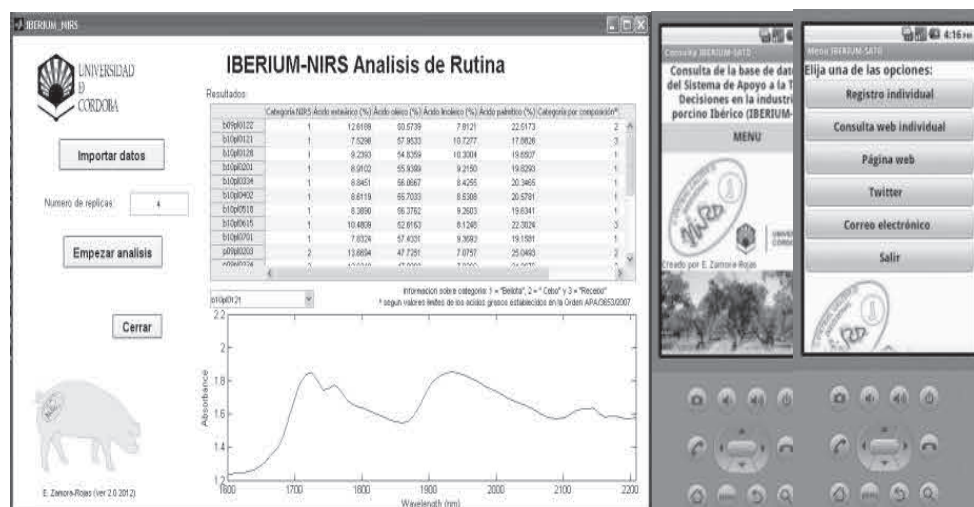


Figura 1: Apariencia de la interfaz gráfica de usuario (izquierda) y aplicación android (derecha) diseñadas, para generar/acceder a la base de datos virtual.

INTEGRATION OF NIRS SENSORS AND INFORMATION AND COMMUNICATIONS TECHNOLOGIES AS A DRIVING FORCE FOR INNOVATION IN THE IBERIAN PIG INDUSTRY

ABSTRACT: An *in-situ* quality control analysis, quantitative (i.e. fatty acid prediction) and qualitative (i.e. feeding regime classification), in the pig carcass process line at the slaughterhouse is evaluated using a handheld micro-electro-mechanical (MEMS)-based Near Infrared (NIR) spectrometer. Based on the models obtained, a Graphical User Interface (GUI) was developed for automatic data analysis considering: spectra repeatability, classification of Iberian pig carcasses on different feeding regime categories and prediction of the major fatty acids composition. These parameters were included in a support decision-making system based on an android mobile application for a fast, simple, easy, economically efficient, reliable, objective and individual quality control of Iberian pig carcasses.

Keywords: Near Infrared Spectroscopy, Support Decision System, Quality Control, Cloud Computing

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE α -TOCOFEROL EN CARNE DE CORDERO A PARTIR DE LA CONCENTRACIÓN DE α -TOCOFEROL EN PLASMA

Molino, F., Blanco, M., Ripoll, G., González-Calvo, L., Calvo, J. H. y Joy, M.
Unidad de Tecnología en Producción Animal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA), Avda. Montañana, 930, 50059 Zaragoza. fmolino@aragon.es.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años el mayor interés de la industria cárnica ha sido prolongar la vida útil de la carne, la cual está condicionada por los procesos oxidativos (Luciano *et al.*, 2009). Uno de los antioxidantes más estudiados y utilizados como aditivos en las dietas de los animales es el grupo del tocoferol (Vitamina E). El α -tocoferol del músculo depende de la ingesta de α -tocoferol en la dieta (Turner *et al.*, 2002) y del tipo músculo (Lee *et al.*, 2006). Dado que el α -tocoferol es una vitamina liposoluble consideramos que tal vez, la cantidad de grasa intramuscular en el músculo podría afectar a la cantidad de α -tocoferol depositada en el músculo.

Para la industria podría resultar interesante conocer el contenido en α -tocoferol de la carne de manera rápida y no destructiva. Una posible manera sería relacionando la concentración de α -tocoferol en el plasma del cordero con la concentración de tocoferol en músculo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es elaborar modelos que permitan estimar la cantidad de α -tocoferol existente en carne teniendo en cuenta la cantidad existente en plasma.

MATERIAL Y METODOS

Animales. En el ensayo se emplearon 62 corderos machos de raza Rasa Aragonesa (Peso vivo inicial = $14,1 \pm 0,25$ kg; edad inicial = $43 \pm 0,8$ d), de los cuales 54 fueron destetados y estabulados y 8 corderos pastaron continuamente con sus madres en una pradera de alfalfa. Durante el ensayo se utilizó un concentrado comercial control y este mismo concentrado enriquecido con 500 mg de DL-acetato de α -tocoferol/kg materia seca. Los corderos estabulados recibieron concentrado, paja y agua a libre disposición. Doce corderos estabulados, elegidos al azar, fueron alimentados durante todo el periodo de cebo con pienso concentrado comercial. El resto de los corderos estabulados fueron alimentados durante diferentes periodos (entre 4 y 42 días) previos al sacrificio con pienso enriquecido con acetato de α -tocoferol. Los 8 corderos que pastaron en la pradera de alfalfa dispusieron además del concentrado comercial control. Todos los corderos se sacrificaron cuando alcanzaron el peso vivo de 23 kg ($\pm 1,38$). El día de sacrificio, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular. La sangre fue centrifugada y el plasma resultante se congeló a -80 °C hasta su posterior análisis. Tras el oreo de la canal (24h a 4 °C), los músculos *Semitendinosus* (ST) y *Longissimus dorsi* (LD) (10^a-12^a vértebra torácica) fueron extraídos para la determinación de la concentración α -tocoferol y el contenido en grasa intramuscular. Las muestras se liofilizaron y congelaron a -80 °C hasta su análisis.

Alimentos. Se tomaron muestras semanales de los alimentos ofrecidos a los animales para conocer su composición química y el contenido en α -tocoferol (Tabla 1). Las muestras de pienso y alfalfa se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

Métodos de análisis: para la determinación de α -tocoferol en forraje se siguió la metodología descrita por Chauveau *et al.* (2010), para el resto de matrices el procedimiento fue el siguiente: 0,2 g de concentrado, 0,2 ml de plasma ó 0,1 g de carne se desproteinizaron con 0,4 ml de etanol. Los componentes lipofílicos fueron extraídos varias veces con hexano. La fase hexánica fue recogida para una posterior evaporación por centrifugación a vacío y el extracto resultante se reconstituyó con 500 μ l de acetonitrilo-metanol-diclorometano (75-15-10). Finalmente, 40 μ l fueron empleados para su determinación por HPLC-DAD (Agilent 1100, Karlsruhe, Alemania). Se empleó una columna 100x4,6 mm, RP C₁₈, 2,6- μ m Kinetex[®]. La fase móvil fue acetonitrilo-metanol-diclorometano-acetato de amonio 0,05 M (75-10-10-5), a flujo isocrático de 1,5 ml/min y el tiempo de análisis por muestra fue de 5 minutos. La identificación de los compuestos se realizó por la comparación de los tiempos de retención (295 nm para el α -tocoferol y 290 nm para el acetato de α -tocoferol) y el análisis espectral de sus patrones. Para la determinación de la grasa intramuscular se picaron y liofilizaron los músculos LD y ST. Las muestras se pesaron antes y después de la liofilización para determinar el contenido en materia seca. Se realizó la determinación de la grasa

intramuscular siguiendo el procedimiento Ankom (AOCS Am 5-04) con un extractor Ankom (Modelo XT10, Ankom Technology, Madrid).

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SAS (v9.3) Se calculó la concentración media, mínima y máxima de α -tocoferol en los alimentos (pienso control, pienso suplementado y alfalfa), el plasma y en los músculos (LD y ST) y la cantidad de grasa intramuscular (LD y ST). Se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple step-wise para cada uno de los músculos estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se observa que el contenido en α -tocoferol de los piensos es algo menor que el teórico y que la alfalfa tiene un contenido menor que el pienso testigo. En la Tabla 2 se muestra la descripción de la concentración de α -tocoferol en plasma, los dos músculos y la cantidad de grasa intramuscular de los dos músculos estudiados. En la Tabla 3 se muestran las correlaciones entre las concentraciones de α -tocoferol y el porcentaje de grasa intramuscular. El contenido en α -tocoferol de los dos músculos estuvo altamente correlacionado entre ellos mismos, así como con el contenido en α -tocoferol del plasma. La correlación entre el plasma y el α -tocoferol del LD fue algo más alta que con el α -tocoferol del ST. No hubo ninguna correlación significativa entre los porcentajes de grasa intramuscular con el α -tocoferol ni de músculo ni de plasma.

En la Tabla 4 se encuentran las ecuaciones de regresión obtenidas, siendo el modelo significativo ($P < 0,001$) en todas. En la obtenida para la concentración de α -tocoferol del músculo LD, se incluye la concentración de α -tocoferol en plasma y la grasa intramuscular del músculo. Cuando únicamente se incluye la concentración de α -tocoferol en plasma, el coeficiente de determinación es superior a 0,60. Aunque no hubo una correlación significativa con el α -tocoferol en músculo, al incluir la grasa intramuscular en la regresión se mejora el coeficiente de determinación de la regresión en 0,03 y se reduce el error de la predicción un 3 %. Esto supone que para mejorar ligeramente la predicción de α -tocoferol en el LD, hay que realizar la determinación analítica de la grasa intramuscular, lo que a la vista de los resultados obtenidos no parece lo más conveniente.

En la regresión obtenida para la concentración de tocoferol en el músculo ST, sólo aparece la concentración de α -tocoferol en suero (Tabla 3). El coeficiente de determinación de la regresión fue inferior que cuando se utiliza el músculo LD. Sin embargo, el error cometido en la predicción es inferior, debido a la menor cantidad de α -tocoferol en el ST.

La diferencia en la predicción entre los dos músculos puede deberse a que el rango de valores de tocoferol y de grasa es mayor en LT que en ST, o podría deberse a la diferente distribución de tipos de fibras musculares en los músculos (las fibras del músculo *ST* poseen mayor capacidad oxidativa que las del *LD* (Totland y Kryvi, 1991)), por lo tanto, mayor capacidad para generar radicales libres y mayor empleo de antioxidantes para inactivarlos.

Finalmente, podríamos concluir que se podría estimar el contenido en α -tocoferol en músculo de una manera no destructiva, a partir de su concentración en plasma, lo que evitaría la devaluación de las canales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Nozière, P. y Graulet, B. 2010. Anal. Bioanal. Chem. 397(2): 777-90.
- Lee, J. H., Waller, J. C., Melton, S. L., Saxton, A. M. 2006. J. Agric. Food Chem. 54: 568-573.
- Luciano, G., Monahanc, F.J., Vasta, V., Pennisi, P., Bella M., Priolo, A. 2009. Meat Sci. 82, 2: 193–199.
- Totland, G., Kryvi, H. 1991. Anatomy and Embr. 184: 441-450.
- Turner, K. E., McClure, K. E., Weiss, W. P., Borton, R. J., Foster, J. G. 2002. Journal of Animal Sci. 80: 2513-2521.

Agradecimientos: Este estudio ha sido sufragado por los proyectos INIA-RTA2009-0091 y por el Grupo de Investigación Consolidado del Gobierno de Aragón (A-49).

Tabla 1. Proteína, Fibra ácido detergente (FAD), fibra neutro-detergente (FND) y concentración de tocoferol en los alimentos (media \pm error estándar)

	Alfalfa	Pienso control	Pienso suplementado
Proteína bruta (%Materia seca)	15,4 \pm 1,4	17,5 \pm 0,3	17,9 \pm 0,4
FAD (%Materia seca)	20,4 \pm 2,2	4,5 \pm 0,3	5,2 \pm 0,1
FND (%Materia seca)	32,6 \pm 2,6	17,9 \pm 0,8	19,0 \pm 1,0
α -tocoferol ($\mu\text{g g}^{-1}$ materia seca)	11,5 \pm 1,6	27,0 \pm 1,2	476,0 \pm 13,0

Tabla 2. Concentración media, máxima y mínima de α -tocoferol en plasma y músculos y grasa intramuscular en los músculos

	Media	Mínimo	Máximo	Rango
Concentración de α -tocoferol				
Plasma ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1,88	0,16	5,41	5,25
Músculo ($\mu\text{g g}^{-1}$ materia fresca)				
<i>Longissimus dorsi</i>	1,05	0,06	3,22	3,16
<i>Semitendinosus</i>	0,85	0,06	2,63	2,57
Grasa intramuscular (% materia fresca)				
<i>Longissimus dorsi</i>	1,74	0,74	4,70	3,96
<i>Semitendinosus</i>	1,65	0,87	2,81	1,94

Tabla 3. Correlaciones entre las variables estudiadas

	Tocoferol _{ST}	Tocoferol _{plasma}	GB _{LD}	GB _{ST}
Tocoferol _{LD}	0,95 ^{***}	0,79 ^{***}	-0,20 ^{ns}	-0,19 ^{ns}
Tocoferol _{ST}		0,70 ^{***}	-0,22 ^{ns}	-0,17 ^{ns}
Tocoferol _{plasma}			-0,07 ^{ns}	-0,17 ^{ns}
GB _{LD}				0,59 ^{***}

Tabla 4. Ecuaciones de predicción de la concentración de tocoferol en músculo a partir del contenido en plasma

	Paso			R ²	RMSE
Tocoferol _{LD}	(2)	= 0,18	+ 0,46 x Tocoferol _{plasma}	0,61	0,501
	(1)	= 0,52	+ 0,46 x Tocoferol _{plasma} - 0,19 GB _{LD}	0,64	0,486
Tocoferol _{ST}	(1)	= 0,23	+ 0,33 x Tocoferol _{plasma}	0,50	0,461

LD: *Longissimus dorsi*; ST: *Semitendinosus*; GB: grasa intramuscular; RMSE: raíz cuadrada del error medio cuadrático

DETERMINATION OF α -TOCOPHEROL CONCENTRATION IN LAMB MEAT USING α -TOCOPHEROL CONCENTRACION IN PLASMA

ABSTRACT: The aim of this study was to estimate α -tocopherol content in lamb meat using α -tocopherol concentration in plasma. Sixty-two lambs were weaned and fed a control concentrate, a concentrate supplemented with acetate of tocopherol, alfalfa for different periods of time until slaughter. At slaughter, blood samples were collected to determine α -tocopherol concentration and after cooling for 24 h (4 °C), *Longissimus* and *Semitendinosus* muscles were excised to determine α -tocopherol content and intramuscular fat content. According to the coefficient of determination, the equation to predict α -tocopherol content in *Longissimus* had better adjustment than in *Semitendinosus* muscle. Concentration of α -tocopherol in *Longissimus* muscle = 0,18 + 0,46 x α -tocopherol concentration in plasma (R²= 0,61; RMSE=0,486) and Concentration of α -tocopherol in *Semitendinosus* muscle = 0,23 + 0,33 x α -tocopherol concentration in plasma (R²=0,50; RMSE= 0,461).

Keywords: α -tocopherol, plasma, muscle, lamb.

SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE SALADO EN JAMÓN IBÉRICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO

Fernández Novales, J., Garrido Novell, C., de Pedro Sanz, E., Guerrero, J. E., Garrido Varo, A y Pérez Marín, D.

Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos, Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agroalimentaria y de Montes, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Campus Rabanales, km. 396, N-IV, 14014, Córdoba.e-mail:g12fenoj@uco.es

INTRODUCCIÓN

Uno de los puntos críticos del procesado de jamones ibéricos es el salado, que se realiza tradicionalmente dejando los jamones enterrados en sal tantos días como kilogramos tenga la pieza. Un elevado número de piezas sale a la venta con cantidades de sal superiores a las adecuadas organolépticamente produciendo rechazo en el consumidor (Armenteros *et al.*, 2012, Andres *et al.*, 2005). La determinación analítica de la concentración de sal, además de ser compleja y lenta, es destructiva y difícil de implantar a nivel de la industria (Huang, *et al.*, 2001). Varias publicaciones muestran el potencial de la tecnología NIRS, para medir el contenido de sal en carne y productos cárnicos, picados y/ o homogeneizados, si bien no existen trabajos publicados que utilicen muestra intacta. El objetivo del presente trabajo es, evaluar el potencial de un instrumento NIRS portátil para el seguimiento del contenido en sal de jamones de cerdo ibérico, durante el proceso de salado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 108 muestras de carne intacta proveniente de seis pernils de jamón ibérico (ibérico puro X Duroc-Jersey), tres provenientes de animales alimentados con pienso y tres alimentados con bellota. Los cerdos fueron sacrificados en la campaña 2010/2011 a la edad de 12 meses en el caso de los animales alimentados con pienso y 15 meses en el caso de los alimentados con bellota. Durante el proceso de salazón (15 días cubierto de sal a 4^º C y HR = 95 %), cada 3 días (0, 3, 6, 9, 12,15) se extrajo 1 muestra de cada jamón con un sacabocados cilíndrico de acero para conseguir una mayor variabilidad del contenido de sal. Estos cilindros de carne se dividieron en tres zonas, según el nivel de profundidad (superficial, exterior e interior).

Las medidas espectrales fueron tomadas con un instrumento portátil MEMS (PHAZIR-1624, Polychromix, Inc., Wilmington, MA, EE.UU.) en el modo de reflectancia (1600-2400 nm). El espectro representativo de cada zona fue el obtenido al promediar los 5 espectros de la misma. El tiempo de integración del sensor fue de 600 ms. La temperatura de las muestras durante la medición fue de 8-10 °C. Una vez realizado el análisis NIRS, las muestras fueron enviadas al laboratorio, para la determinación de la concentración de cloruros mediante volumetría MOHR (BOE,1979).

La selección de muestras, para los colectivos de calibración y validación, se realizó de forma estructurada, utilizando el algoritmo Center incluido en el software WinISI, ver.1,50 (Infrasoft Internacional, Port Matilda, PA, EE.UU.). Se eliminaron 9 espectros anómalos y las 99 muestras restantes se dividieron en dos colectivos diferentes: 79 muestras de calibración (80%) y 20 de validación externa (20%, tabla 1).

Para el tratamiento quimiométrico de los datos espectroscópicos y químicos generados se empleó el software WinISI 1.05 (ISI, 2000). Previamente a la obtención de modelos de regresión MPLS, entre los datos espectroscópicos y el porcentaje de cloruro sódico, se hizo un pre-tratamiento de espectros mediante derivación y reducción del efecto scatter. Los estadísticos utilizados para la selección de las mejores ecuaciones de calibración fueron: el error típico de los residuales (ETVC) y el coeficiente de determinación (R^2_{VC}) para el colectivo de validación cruzada. Para el proceso de validación se utilizó el procedimiento

desarrollado por Shenk *et al.* (1989) que entre otros estadísticos, utiliza los valores de error típico de predicción con y sin corregir por el sesgo (ETP, y ETP (C)).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede apreciar en la tabla 1, ambos colectivos de calibración y validación muestran la amplia variabilidad del parámetro estudiado durante la etapa de salado. Los valores más bajos correspondieron a las muestras interiores mientras que los valores más altos se alcanzaron en las muestras superficiales de los últimos días de control del salado.

A pesar, de que por definición, el cloruro sódico no absorbe en la región del infrarrojo cercano, el contenido en sal podría ser medido indirectamente, como consecuencia de desplazamientos en las bandas de absorción de agua (Begley *et al.*, 1984). De hecho, las ecuaciones obtenidas para la predicción del contenido de sal durante el proceso de salado del jamón ibérico (tabla 2), presentan una elevada capacidad predictiva, con porcentajes de varianza explicada superiores al 84%, presentando la mejor ecuación un $R^2_{VC} = 0,87$ y un $ETVC = 1,13\%$. En la tabla 3 se puede apreciar, cómo afectan los diferentes pre-tratamientos a la precisión y exactitud de las ecuaciones. A pesar de que los valores del ETC y ETP resultaron muy similares, para todos los tratamientos ensayados, sólo la ecuación obtenida utilizando primera derivada y corrección de scatter (SNV), presenta valores del ETP(C), dentro de los límites de control establecidos por Shenk *et al.* (1989), esto es $ETP(C) \text{ límite} = ETC \times 1,3$.

En jamón curado, solo existe un trabajo publicado, que evalúe la tecnología NIRS, para la predecir la concentración de sal (Prevolnick, *et al.*, 2011). Dichos autores obtienen valores de $R^2_V = 0,90$ y $ETP = 0,44\%$, si bien utilizan la región VIS+ NIRS (400-2500 nm) y el análisis se realiza sobre producto picado. El mas alto valor de ETP obtenido en la mejor de las ecuaciones desarrolladas en el presente trabajo ($ETP = 0,98\%$) puede deberse a diferentes factores: el análisis se realiza sobre producto intacto, el instrumento portátil utiliza un rango de medida reducido (1600-2400 nm), y el colectivo de calibración está poco equilibrado, en cuanto al número de muestras representativas de los diferentes porcentajes de sal. Sin embargo, la capacidad predictiva de la mejor de las ecuaciones es suficiente, para el realizar un seguimiento continuo de cada pieza durante el proceso de salado. La información obtenida utilizando tecnología NIRS-MEMS, es útil para animar al sector industrial, a continuar colaborando en esta "costosa" (en cuanto al alto valor de las piezas de jamón) línea de investigación, y asimismo, para informar a las empresas que desarrollan instrumentación NIRS portátil, de la necesidad de inversión en instrumentos portátiles, como el utilizado en este trabajo, pero con un mas amplio rango de medida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andres, A.I., Ventanas, S., Ventanas J., Cava, R., Ruiz, J. 2005. Eur. Food Res. Technol. 221:30-35.
- Armenteros, M., Aristoy, M., Barat, J.M., Toldrá, F. 2012, Meat Sci. 90:361-367.
- Begley, T. H., Lanza, E., Norris, K. H., Hruschka, W. R. 1984. J. Agric. Food Chem. 32: 984–987.
- BOE.1979. Orden de 31 de Julio de 1979 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aceite y grasas, productos cárnicos, cereales y derivados, fertilizantes, productos fitosanitarios, productos lácteos, piensos, agua y productos derivados de la uva.
- Huang, Y., Rogers, T. M., Wenz, M. A., Cavinato, A. G., Mayes, D. M., Bledsoe, G. E., Rasco, B. A. 2001. J. Agric. Food Chem., 49(9): 4161–4167.
- Prevolnik, M., Škrlep, M., Janeš, L., Velikonja-Bolta, S., Škorjanc, D., Čandek-Potokar, M. 2011. Meat Sci. 88: 299-304.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., Abrams, S.M. 1989. Analysis of forage quality. Marten, G.C., Shenk, J., Barton, F.E. (eds.). USDA. ARS. Agriculture Handbook N° 643, Washington, USA. p. 104-110.

Agradecimientos: El presente trabajo se ha desarrollado en el marco del Proyecto CDTI “Implantación de tecnologías innovadoras en el proceso de elaboración del jamón ibérico de los Pedroches”. Nuestro agradecimiento a las empresas que han colaborado en el suministro de muestras (Celestino Gómez Parra, S.A., Sociedad Cooperativa Ganadera Andaluza del Valle de Los Pedroches (COVAP), Jamones y embutidos LA FINOJOSA S.L., Ibérico de bellota S.A. (IBESA), Hermanos RODRÍGUEZ BARBANCHO S.L.).

Tabla 1. Caracterización del colectivo muestral completo, de calibración y validación.

Parámetro		Colectivo muestral completo (n=99)	Colectivo de calibración (n=79)	Colectivo de validación (n=20)
CINa (%)	Rango	0,01-10,6	0,01-10,6	0,01-7,7
	Media	2,22	2,23	2,18
	DT	3,08	3,21	2,56

Tabla 2. Estadísticos de calibración para la predicción del contenido de sal en jamón.

Parámetro	Derivada	N	Media	DT	Rango	R ² vc	ETVC
CINa (%)	1,4,4,1 SNV + DT	73	1,99	3,09	0,01-10,6	0,87	1,13
	1,4,4,1	73	1,99	3,11	0,01-10,6	0,84	1,25
	2,4,4,1 SNV + DT	74	2,015	3,07	0,01-10,6	0,84	1,22
	2,4,4,1	74	2,11	3,23	0,01-10,6	0,87	1,16

Tabla 3. Estadísticos de validación externa (N = 20) para las ecuaciones de la tabla 2

Parámetro	Derivada	Media	DT	ETP	ETP(c)	Sesgo	R ² v
CINa (%)	1,4,4,1 SNV + DT	2,18	2,56	0,98	1,01	-0,04	0,86
	1,4,4,1	2,18	2,56	1,35	1,31*	-0,44	0,76
	2,4,4,1 SNV + DT	2,18	2,56	1,02	1,04*	-0,12	0,84
	2,4,4,1	2,18	2,56	1,09	1,09*	-0,26	0,87

MONITORING SALTING PROCESS OF IBERIAN HAM BY NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate a portable MEMS-NIRS instrument to predict salt content in Iberian pig hams during the salting process. The results obtained suggest, that the predictive ability (SEP =0,98; R² = 0,86) of the best equation obtained for the prediction of the salt content is enough, to ensure continuous monitoring of each individual ham during the salting process.

Keywords: Iberian ham, Salt, MEMS-NIRS, quality control

PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DEL VETEADO EN CAÑA DE LOMO IBÉRICA USANDO CÁMARAS HIPERESPECTRALES

Garrido-Novell, C., Pérez-Marín, D. C., Garrido-Varo, A., Fernández-Novales, J., Kim, M. y Guerrero-Ginel, J. E.

ETSIAM, Dpto. Producción Animal, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid km 396 N-IV, 14071 CORDOBA. Email: g52ganoc@uco.es

INTRODUCCIÓN

El veteado (cantidad y distribución de las vetas de grasa intramuscular) en productos curados del cerdo ibérico (IP) (jamones, lomos y embutidos) es uno de los factores más importantes en la clasificación por calidades. Es evaluado generalmente por expertos de manera subjetiva; siendo además las vetas de grasa de la carne de IP curada menos visibles que las de carne de cruces de Ibérico y Duroc (Ventanas et al., 2007). Diferentes autores (Faucitano et al., 2005, Cernadas et al., 2002; Qiao et al., etc.) han abordado la evaluación del veteado en productos frescos y curados del cerdo mediante el reconocimiento de patrones y el establecimiento de parámetros cuantitativos en imágenes monocromáticas. La adición de información espectral a la información espacial contenida en una imagen monocromática puede aportar una información complementaria muy valiosa que de ningún modo podría alcanzarse con el uso de ambas técnicas por separado. El objetivo principal de este trabajo es desarrollar y evaluar una metodología para una caracterización precisa y no subjetiva-del veteado en caña de lomo ibérica en base a la información proporcionada por cada pixel de una imagen hiperespectral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 9 muestras transversales de la parte central de 9 cañas de lomo curadas de diferentes calidades. Las tres primeras muestras provinieron de tres cerdos ibéricos puros alimentados con bellota (IB-A), las segundas tres procedían de Ibérico cruzado con Duroc-Jersey, alimentado con bellota (IBxD-A), y las tres últimas procedían de cerdos Duroc Jersey alimentados con alimento concentrado (DC). De cada muestra se adquirieron sendas imágenes RGB y espectrales. Las muestras fueron seleccionadas, de forma tal que reunieran variabilidad de veteado. El equipo hiperespectral de adquisición de imágenes está formado por un espectrómetro NIR Specim (ImSpector V10E) que realiza medidas en el rango 900 a 1700 nm, una cámara de barrido (XEVA-FPA-1.7-320-XeniCs CCD), con una resolución de 320x256 píxeles y dos lámparas halógenas (250 W).

Se evaluaron diferentes pretratamientos matemáticos (corrección de la dispersión multiplicativa (MSC), variable normal estándar (SNV), autoescalado, centrado (MC), primera y segunda derivada de Savitzky-Golay con distintas ventanas y órdenes polinomiales, suavizados de diferentes órdenes polinomiales y ventanas, y la combinación de todos ellos) para minimizar la influencia de factores no controlados (Grahn and Geladi, 2007), así como distintas metodologías de segmentación del fondo (mediante unbralización de ratios entre bandas o de imágenes proyectadas sobre los primeros componentes principales). La evaluación de los distintos pretratamientos se llevó a cabo mediante la comparación de las nuevas imágenes formadas (scores) a partir de los espectros proyectados en los nuevos Componentes Principales procedentes de un Análisis de Componentes Principales de cada imagen pretratada.

Para determinar el nivel de grasa en cada píxel en función de todo el espectro adquirido, se aplicó el modelo Fuzzy Cluster Means (FCM) a cada imagen espectral pretratada (Bezdek, 1987). El modelo FCM calcula el grado de pertenencia o similitud entre cada espectro y el espectro central de las dos clases más importantes. Se trata de un modelo de agrupamiento no supervisado (Amigo, 2010). A partir de la información del nivel de grasa de cada espectro, de cada píxel, se construyeron imágenes de nivel de grasa (ING). Con el fin de obtener un parámetro que resumiera toda la información textural contenida en estas imágenes, se ensayaron varios estadísticos (homogeneidad, segundo momento angular, correlación y contraste), optando finalmente por el estadístico contraste. Este se calculó a partir de las matrices de coocurrencia (Qiao et al., 2007), matrices que muestran la frecuencia de cada combinación de pares de valores contiguos, en este caso entre 0

(magro) y 1 (grasa). El contraste es un indicador de la intensidad de la diferencia entre los valores de píxeles vecinos en toda la imagen (medida del contraste local). Es 0 para una imagen constante, y es mayor en tanto menos homogénea es la imagen, considerando pares de valores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de componentes principales realizado sobre las imágenes brutas para la segmentación muestra-fondo, nos indicó que las dos primeras Componentes Principales recogían alrededor del 99 % de la varianza en todas las imágenes. Ambos tipos de segmentación (por ratios y por componentes principales) mostraron resultados similares ya que el fondo consistía en una lámina de plástico negro. Algunos píxeles tuvieron que ser retirados manualmente en algunas imágenes debido al efecto de la fusión parcial de grasa.

El mejor pretratamiento, una vez eliminado el fondo, se obtuvo combinando un MC y una primera derivada de segundo orden polinomial y ventana de 11. De este modo los CPs sucesivos incrementaron la varianza explicada, restando al primero en torno al 80 % de la varianza explicada para todos los casos. Comparando cada primer score con su correspondiente imagen RGB, puede apreciarse la forma en que éste se refiere al componente grasa (superficie más o menos grasa). En la fig. 1 pueden apreciarse los 5 primeros scores para una imagen de la categoría ID-A una vez eliminado el fondo y pretratada.

Asimismo, puede apreciarse en el primer score cómo el componente grasa es más difuso que en la imagen RGB (Fig. 1). Los cerdos ibéricos puros tienen adipocitos más pequeños, irregulares y débiles que sus cruces (ibérico x Duroc-Jersey). Durante el curado los adipocitos de cerdo ibérico puro se rompen liberando y difundiéndose la grasa en la carne (Ventanas et al., 2007). El objetivo de utilizar el modelo FCM sobre información espectral completa de cada píxel fue el de obtener una predicción cuantitativa del nivel de grasa de cada uno de ellos para obtener un grado de pertenencia de cada espectro-píxel al grupo grasa. Las INGs de tres muestras representativas de cada categoría pueden observarse en la figura. 2, donde pueden apreciarse tanto el espectro central de las dos clases principales (grasa y magro) como la matriz de coocurrencia. Las matrices de coocurrencia muestran la frecuencia de cada par contiguo de valores (de 0-magro-a 1-grasa-, en 100 partes) en cada ING, dándonos una idea sintética de la distribución de niveles de grasa. Así, una concentración de valores altos (mayores frecuencias) en la diagonal nos indican una elevada frecuencia de pares de valores similares, mientras que un peso mayor de un extremo de la diagonal o la otra nos está indicando una mayor frecuencia de coocurrencia de valores altos (próximos a 1) o bajos (próximos a 0) de grasa. El mayor peso de su centro indica la coocurrencia de valores cercanos a 0,5. Las matrices de coocurrencia se calcularon para todas las orientaciones posibles de un par de píxeles, es decir, 0° , 45° , 90° y 135° . Se muestran en la Fig. 2 las matrices de coocurrencia de 0° . Aunque no se puede ver ninguna tendencia clara, si se representan los valores de contraste de cada muestra ordenadamente, el valor del contraste medio de las tres muestras del primer grupo (PI-A) resultó superior al valor medio de los otros grupos (ID-A y-DC) (Fig. 3).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amigo, J. M. 2010. Anal Bioanal Chem. 398:93-109 • Bezdek J. C. 1987. Pattern recognition with F. O. F. A.. Ed. Plenum P • Burger, J., Geladi, P. 2005. J Chemometr. 19:355-363 • Cernadas, E., Durán, M. L., Antequera, T. 2002. Pattern Recongn Lett. 23:1311-1321 • Faucitano, L., Huff, P., Teuscher, F., Gariépy, C., Wegner, J. 2005. Meat Sci. 69:537-543 • Graham and Geladi. 2007. Ed. J. Wiley & Sons, Ltd • Qiao, J., Ngadi, M. O., Wang, N., Gariépy, C., Prasher, Shiv. O. 2007. J. of Food Eng. 83:10-16 • Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J. 2007. Meat Sci.. 75:211-219 • Vidal, M., Amigo, J. M. 2012. Chemom. Intell. Lab. Syst 117:138-148.

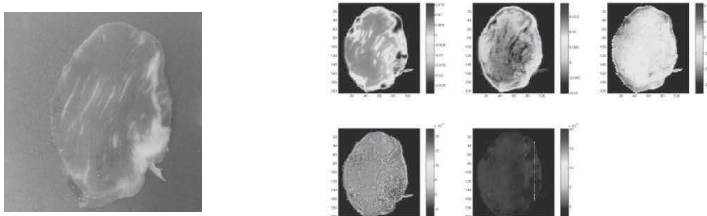


Figura 1. Las imágenes RGB, los cinco primeros scores del análisis de componentes principales de la imagen espectral de una muestra representativa de la categoría ID-A.

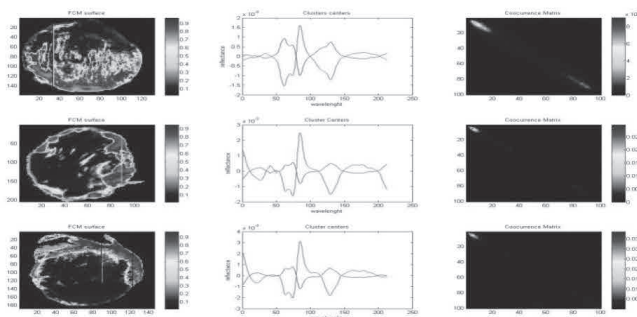


Figura 2. ING, espectros centrales de los dos grupos principales (grasa y carne) y matriz de coocurrencia (de izquierda a derecha) de tres muestras representativas de cada categoría.

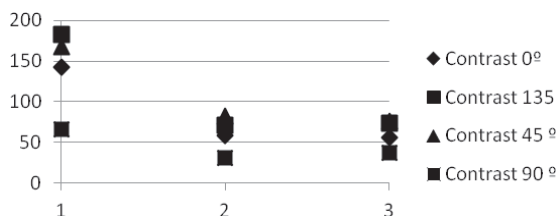


Figura 3. Contraste medio para cada categoría (1, PI-A, 2, ID-A and 3 D-C).

SETTING A METHODOLOGY PROCEDURE FOR THE EVALUATION OF MARBLING IN CURE IBERIAN LOIN USING A HIPERSPECTRAL CAMERA

ABSTRACT: a procedure based on hyperspectral image analysis for an objective evaluation of marbling of iberian pig cured loins was proposed. Spectral information of each pixel was used to make a fuzzy cluster mean (fcm) model, resulting fat level images. A textural analysis was carried out using cooccurrence matrix and contrast.

Keywords: hyperspectral imaging, iberian pig, textural analysis, marbling

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ENGRASAMIENTO DE CANALES BOVINAS MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN

González¹, L., Mendizábal¹, J.A., Albertí², P., Ripoll², G. y Purroy¹, A.

¹ETSIA. Universidad Pública de Navarra. 31006 Pamplona. e-mail: jamendi@unavarra.es

²CITA. Gobierno de Aragón. Avenida de Montañana 930, 50059 Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

La conformación y el engrasamiento son dos de los principales criterios a la hora de establecer la calidad y el precio de las canales bovinas. En ellos se fundamenta el método europeo oficial de clasificación de canales bovinas (reglamento CEE 1026/91). Así, los clasificadores oficiales son los que, mediante el uso de patrones fotográficos, asignan una nota de conformación (escala S-E-U-R-O-P) y otra de engrasamiento (escala 1-5) a las canales bovinas. Sin embargo, en estos últimos años se están desarrollando diferentes tecnologías (NIRS, Análisis de imagen,...) con objeto de conseguir un mayor grado de objetividad y de precisión a la hora de determinar la calidad de las canales (Oliver *et al.*, 2010; Craigie *et al.*, 2012). En este sentido, en el presente trabajo se desarrolla la técnica del análisis de imagen para cuantificar el grado de engrasamiento de las canales bovinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 25 canales bovinas de $371 \pm 28,1$ kg procedentes de terneros de raza Pirenaica sacrificados con $588 \pm 49,3$ kg de peso. Tras el faenado, se asignó la nota de engrasamiento (escala 1-5) a cada una de las canales. Así mismo, de cada una de ellas se tomó una fotografía (Cámara digital Olympus C2500L) de la cara lateral izquierda, teniendo especial cuidado en que las fotografías se realizaran siempre en la misma posición y con idénticas condiciones de iluminación. Mediante el programa de análisis de imagen *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) se procesaron las imágenes para calcular el grado de recubrimiento graso de la canal. Para ello, se binarizó la imagen (formato 8 bits) y se contorneó el área correspondiente a la canal. A continuación, basándose en la escala de coloración de nivel de gris, que establece para cada pixel de la imagen un valor comprendido entre 0 (negro puro) y 255 (blanco puro), se estableció un valor umbral (*threshold*) de nivel de gris óptimo que fuera capaz de discriminar las zonas más blancas de la canal (correspondientes a la grasa de cobertura) de las más oscuras (correspondientes a las zonas no cubiertas de grasa). Estos valores umbrales óptimos estuvieron comprendidos entre 100 y 112 para las distintas canales bovinas. Para lograr un mayor grado de estandarización de la técnica se decidió aplicar un mismo valor umbral en todas las imágenes, de manera que se eligió el valor medio de 106. De esta manera, se consideró que el área resultante del agrupamiento de todos los píxeles cuyo valor de nivel de gris era superior a 106 unidades era representativa del área de la canal recubierta de grasa y a éste parámetro es al que se le denominó "área de recubrimiento graso de la canal". En la Figura 1 se ilustran los diferentes pasos de la técnica.

Por otra parte, a las 24 horas *post-mortem* se llevó a cabo el despiece de las canales siguiendo la metodología descrita por Carballo *et al.* (2005) para obtener las diferentes piezas comerciales de la canal. En dicho proceso se registraron los pesos de las diferentes porciones de grasa (fundamentalmente pelviorrenal, intermuscular y subcutánea) que no entraron a formar parte de las piezas comerciales, y a cuya suma se denominó "grasa de despiece", utilizándose también este parámetro como indicador del engrasamiento de las canales.

Mediante análisis de varianza se estudiaron las diferencias en el *área de recubrimiento graso* y en la cantidad de *grasa de despiece* en función de la nota de engrasamiento de las canales. Así mismo, mediante análisis de regresión se estudió la relación entre los dos primeros parámetros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La asignación de la nota de engrasamiento según el método oficial (escala 1-5) tuvo como resultado el agrupamiento de las canales de terneros de raza Pirenaica en 3 grupos: nota 2-

(n=4), nota 2 (n=16), nota 2+ (n=5). A pesar de que las canales correspondían a terneros sacrificados a pesos elevados (588 kg de peso vivo) no mostraron un excesivo engrasamiento, característica que se repite cuando se trata de terneros de raza Pirenaica (Indurain et al., 2009; Albertí et al., 2012).

En la Tabla 1 se muestran las cantidades de grasa de despiece y las áreas de recubrimiento graso de los 3 grupos de canales en función de su nota de engrasamiento. En ella se observa que conforme aumenta la nota de engrasamiento de las canales aumentan proporcionalmente la cantidad de grasa de despiece ($P < 0,001$) y el área de recubrimiento graso ($P < 0,05$) de las mismas. Así por ejemplo, una nota de engrasamiento de 2+ se correspondería con una canal que tiene aproximadamente la mitad de su superficie cubierta de grasa.

Cuando se estudia la relación entre estos dos caracteres mediante análisis de regresión (Figura 2) se observa que existe una relación positiva y significativa entre ambos, obteniéndose un coeficiente de determinación (R^2) de 0,57 ($P < 0,001$). Este resultado es superior al que se obtiene de la regresión entre la nota de engrasamiento (con el handicap de que todas las canales se agrupan en solo 3 notas) y la grasa de despiece ($R^2 = 0,49$; $P < 0,001$). Resultados del mismo orden ($R^2 = 0,48$) obtuvieron Prieto et al. (2009) al relacionar la cantidad de grasa subcutánea de la canal con diferentes medidas obtenidas mediante análisis de imagen en canales de terneros de las razas Aberdeen Angus y Limousin.

Por tanto, los resultados del presente trabajo vendrían a indicar que la medida mediante análisis de imagen del área de recubrimiento graso de la canal puede ser considerada como un adecuado indicador del engrasamiento de las canales de terneros pirenaicos. No obstante, antes de generalizarlo a canales de otras razas o sistemas de producción, sería conveniente testar el método de análisis de imagen con canales que abarcaran el mayor rango posible de notas de engrasamiento, a poder ser desde 1 hasta 5.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertí P., Campo M.M., Purroy A., Mendizabal J.A., Ripoll G., Panea B., Olleta J.L., Roncalés P., Sarriés M.V., Arana A., Beriain M.J., Sañudo C. 2012. Eurocarne 211 : 59-65.
- Carballo J.A., Monserrat L., Sánchez L. 2005. Monografías INIA : Serie Ganadera 3 : 120-140.
- Craigie C.R., Navajas E.A., Purchas R.W., Maltin C.A., Bünger L., Hoskin S.O., Ross D.W., Morris S.T., Roehe R. 2012. Meat Sci. 92 : 307-318.
- Indurain G., Carr T.R., Goñi M.V., Insausti K., Beriain M.J. 2009. Meat Sci. 82: 155-161.
- Oliver A., Mendizabal J.A., Ripoll G., Albertí P., Purroy A. 2010. Meat Sci. 84 : 628-633.
- Prieto N., Ross D.W., Navajas E.A., Richardson R.I., Hyslop J.J., Craigie C., Simm G., Roehe R. 2010. Adv. An. Bioscie. 1:285.

Tabla 1. Grasa de despiece y área de recubrimiento graso de la canal en función de la nota de engrasamiento (1-5) asignada a las canales de terneros de raza Pirenaica

Nota Engrasamiento	2- (n=4)	2 (n=16)	2+ (n=5)	P
Grasa despiece (%)	6,6±1,15 ^a	8,5±1,81 ^b	12,0±1,98 ^c	<0,001
Área recubrimiento graso (%)	32,2±6,12 ^a	41,8±8,31	48,8±4,58 ^b	0,011
Comparación entre grupos : ^{a,b,c} letras distintas, $P \leq 0,05$; letras iguales o ausencia de letras, $P > 0,05$.				

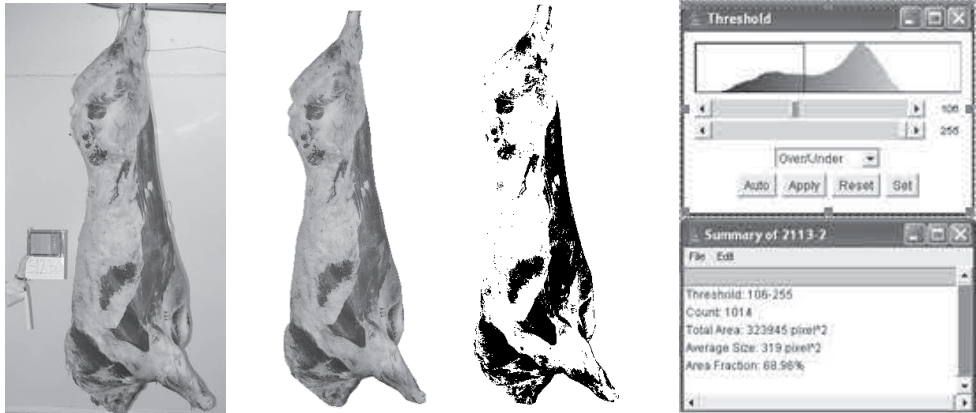


Figura 1. Procesamiento de la imagen para la cuantificación del área de recubrimiento graso de la canal.

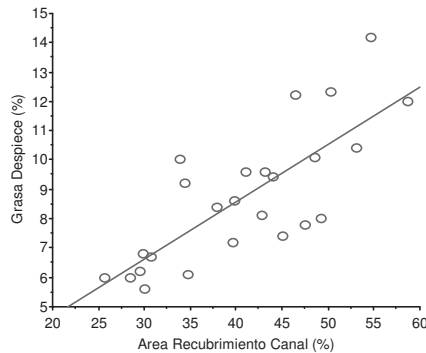


Figura 2. Regresión entre la cantidad de grasa de despiece y el área de recubrimiento graso de la canal.

PREDICTING BEEF CARCASS FATNESS BY AN IMAGE ANALYSIS SYSTEM

ABSTRACT: The amount and distribution of subcutaneous fat is an important factor affecting the carcass quality of young bulls. Fatness degree is determined by visual assessments according to five fatness scores. New technologies like image analysis have been developed with the goal to accurate and give objectivity at a more important degree to this classification system. In this work, 25 Pirenaica young bulls were slaughtered (588 ± 49.3 kg) and after slaughtering the carcasses were weighed (371 ± 28.1 kg) and a fatness score was assigned. A digital picture was taken of the left exterior carcass side on which fat area measurement (*Fat area*) was taken by image analysis system. The commercial cutting of these carcasses was made 24h *post mortem*. The resulting fat from the cutting was weighed (*Cutting fat*). A regression analysis between carcass *Fat area* (x, variable) and carcass *Cutting fat* (y, variable) was made to know the accuracy of the image analysis system. Higher accuracy was obtained with the image analysis system ($R^2=0.58$) than with the visual fatness score ($R^2=0.49$). These results show that Image Analysis system is more accuracy than the visual assessments system for predicting beef carcass fatness.

Keywords: carcass fat, image analysis, young bulls.

ESTIMACIÓN META-ANALÍTICA DE LA REDUCCIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN CANALES DE BOVINO DEBIDO AL ENFRIAMIENTO

Gonzales-Barron, U.¹, Cadavez, V.¹ y Butler, F.²

¹Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. Campus de Santa Apolónia, Bragança. Portugal. E-mail: ubarron@ipb.pt

²UCD School of Biosystems Engineering, University College Dublin, UCD Belfield, Dublin 4. Irlanda

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal del meta-análisis es comparar e integrar los resultados de varios estudios primarios que investigan el mismo tema. El meta-análisis produce un estimado más preciso del efecto de un tratamiento o intervención, así como también permite explicar las posibles diferencias entre los estudios independientes. Este estimado meta-analítico – llamado ‘efecto promedio’ – tendrá un mayor poder estadístico y una mayor capacidad de generalización que cualquier resultado individual.

La prevención de enfermedades humanas, causadas por agentes zoonóticos en carnes, es compleja debido a las múltiples etapas en su procesamiento. Antes de implementar cualquier programa de inocuidad alimentaria, es necesario identificar los tratamientos que sean efectivos en la reducción de la contaminación. Así, existe una necesidad de conducir meta-análisis en los campos de zootecnia e inocuidad alimentaria con la finalidad de identificar, evaluar y sintetizar los resultados de muchas fuentes bibliográficas. Esta información proveer las autoridades nacionales información resumida sobre la eficacia de intervenciones para el control de las enfermedades transmitidas por alimentos. El objetivo de este trabajo fue utilizar métodos meta-analíticos para cuantificar el efecto del enfriamiento convencional de canales de bovino en la concentración de coliformes totales, integrando resultados de diferentes estudios llevados a cabo en mataderos irlandeses de carne de exportación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nueve estudios independientes investigando el efecto del enfriamiento convencional en los recuentos de coliformes en canales de bovino fueron conducidos en mataderos irlandeses de carne de exportación. En cada uno de los mataderos (estudios), se obtuvieron muestras mediante hisopado de aproximadamente 10 000 cm² de un lado de la canal antes de la etapa de enfriamiento convencional y 10 000 cm² del otro lado de la misma después del enfriamiento (24 h). Los coliformes totales (log CFU/cm²) fueron cuantificados de acuerdo al método ya descrito en Gonzales-Barron *et al.* (2011). Los resultados sintéticos de cada uno de los estudios independientes (centros de matanza) están compilados en la Tabla 1, y consisten de medias (μ), desviaciones estándar (σ) y número de muestras (n) tanto para el grupo de canales antes del enfriamiento (subíndice C) como para las del grupo de post-refrigeración (subíndice T). En todo meta-análisis se deben considerar tres facetas: población, tratamiento y la variable de medida. La población fue restringida a las canales de bovino de mataderos irlandeses; el tratamiento abarca el enfriamiento y el almacenamiento en frío hasta 24h; y la variable medida es la concentración de coliformes en la superficie de las canales. El meta-análisis procede con la definición de una métrica común que permita la comparación directa y la sumatoria de los estudios independientes. Como los datos generados por los estudios son de tipo variable continua, el parámetro que definirá el efecto promedio θ del tratamiento es la “diferencia absoluta de medias” (concentración de coliformes en la canal post-enfriamiento μ_T menos la respectiva concentración pre-enfriamiento μ_C ; Tabla 1). Usando el paquete ‘metafor’ (Viechtbauer, 2010) del software R (R Development Core Team, 2011), se ajustaron modelos de meta-análisis de efectos fijos (i.e., considera que cada estudio independiente estima en sí el mismo efecto medio y que las diferencias entre estudios ocurren sólo por error de muestreo) y de efectos aleatorios (i.e., incluye la heterogeneidad entre estudios, asumiendo que el efecto verdadero calculado en cada estudio se origina de una variable al azar que se distribuye como una normal). Se estimó la variabilidad entre estudios (τ^2) o heterogeneidad, así como su significancia estadística por medio de los valores de Q_{test} e I^2 (Gonzales-Barron *et al.*, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del meta-análisis están compilados en el forest-plot que se muestra en la Figura 1. El forest plot presenta el efecto del enfriamiento medido en cada estudio, así como el efecto promedio calculado por los modelos de meta-análisis de efectos fijos y de efectos aleatorios. En meta-análisis, a los estudios independientes con mayor tamaño de muestra (n) normalmente se le asigna un mayor peso en el cálculo del efecto promedio, lo cual en el forest-plot se representa con el tamaño del marcador central (Figura 1). Nótese que a medida que el tamaño de muestra de un estudio independiente es menor (i.e., mayor incertidumbre en los resultados), el error estándar del efecto observado es mayor, y por tanto, el peso asignado a los resultados de ese estudio es menor. En los nueve estudios primarios, se observó que la etapa de enfriamiento y refrigeración es beneficiosa para la disminución de la viabilidad de los coliformes fecales en las canales de bovino (Figura 1). La heterogeneidad total entre estudios (τ^2) fue de 0,288 ($p < 0,001$) según la prueba de heterogeneidad del Qtest. Del mismo modo, la prueba de I^2 indicó que una gran proporción de la variabilidad total (88%) puede atribuirse a la heterogeneidad entre estudios. Una serie de factores pueden haber dado lugar a la variabilidad significativa entre estudios; las cuales pueden abarcar diferencias en la incidencia de agentes patógenos fecales en el ganado de procedencia, diferencias en los niveles de contaminación de los mataderos, diferencias en las prácticas de beneficio entre mataderos, diferencias en la logística del beneficio del animal, diferencias en el tamaño de los mataderos, etc. Por consiguiente, el modelo meta-analítico más adecuado es el de efectos aleatorios, que incluye la variabilidad entre estudios, y por tanto produce un intervalo de confianza del efecto promedio que es mayor que aquél del modelo de efectos fijos (Figura 1). Así, se puede decir que, en general, el enfriamiento de canales de bovino reduce significativamente la viabilidad de los coliformes ($p < 0,001$), con un efecto reductor promedio de $\theta = 1,08 \log \text{CFU/cm}^2$ (IC 95%: 1,5 – 0,70 log). Sin embargo, dada la alta heterogeneidad entre los efectos observados por los nueve estudios primarios, podría aún ser posible extraer de los estudios independientes, variables moderadoras o características de estudio (Gonzales-Barron *et al.*, 2013) que puedan explicar parte de esa variabilidad. Por medio de este estudio de meta-análisis, se comprobó estadísticamente que la etapa de enfriamiento y refrigeración de las canales de bovino en el proceso de producción de carne irlandesa disminuye la concentración de coliformes totales en aproximadamente 1 log CFU/cm² con un intervalo de confianza al 95% de 1,5 – 0,7 log.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., Sheridan, J., & Butler, F. 2013. Modelling the effect of chilling on the occurrence of Salmonella on pig carcasses at study, abattoir and batch levels by meta-analysis. *Int. J. Food. Micr.* Accepted, in press.
- Viechtbauer, W. 2010. Conducting meta-Analyses in R with the 'Metafor' package. *J. Statistical Software* 36(3), 1-48.

Tabla 1. Datos originales no publicados de los nueve estudios primarios que cuantifican la concentración de coliformes totales ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) en canales de bovino antes y después del enfriamiento.

Estudio <i>i</i> (Matadero)	Pre-enfriamiento			Post-refrigeración (24 h)			Efecto observado (θ_i)
	Muestras (n_c)	Media (μ_c)	Des. Est. (σ_c)	Muestras (n_T)	Media (μ_T)	Des. Est. (σ_T)	
1	59	0.987	1.564	60	0.880	1.690	-1.867
2	90	-0.338	0.654	90	-1.332	1.485	-0.994
3	90	-0.371	0.740	90	-1.618	1.144	-1.247
4	60	-0.656	1.157	60	-0.823	1.425	-0.167
5	90	-1.140	0.921	90	-1.735	1.308	-0.594
6	60	0.472	1.120	60	-0.179	2.428	-0.652
7	60	-0.064	0.955	57	-1.315	1.132	-1.251
8	60	0.963	1.231	59	-1.129	1.687	-2.093
9	90	-0.705	1.214	90	-1.624	1.073	-0.919

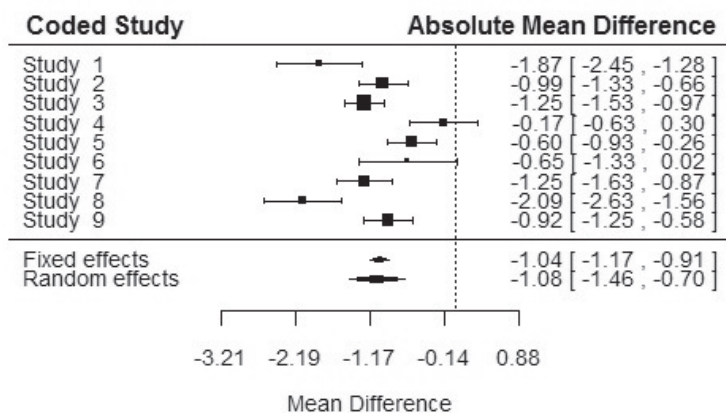


Figura 1. Forest-plot del efecto de la refrigeración de canales de bovino en la concentración de coliformes totales, medidos por cada estudio, y los efectos promedios estimados por los modelos meta-analíticos de efectos fijos (fixed effects) y efectos aleatorios (random effects).

META-ANALYTICAL ESTIMATION OF THE EFFECT OF CHILLING ON THE TOTAL COLIFORMS OF BOVINE CARCASSES

ABSTRACT: The objective of this work was to use meta-analysis to quantify the overall effect of conventional chilling of Irish beef carcasses on the concentration of total coliforms. Nine independent studies concerning the effect of conventional chilling of Irish beef carcasses on the concentration of total coliforms were used. In each study (slaughterhouse), swabs of 10 000 cm^2 from one side of the carcass were obtained before carcasses chilling and the same procedure was applied on the other side of the carcass after 24 h of chilling, and the total coliforms ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) were quantified. To account for the variability or heterogeneity ($\tau^2=0.288$; $p<0.001$) in the effect size (measured by the nine primary studies), a random-effects model was preferred. This model confirmed that chilling reduces ($p<0.001$) the viability of coliforms in 1 $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ (95% CI: 1.5 - 0.70 log). Next, study characteristics could be extracted from the primary studies to further explain the high between-study heterogeneity.

Keywords: abattoir, beef carcasses, chilling, coliforms.

ESTUDIO DE META-ANÁLISIS DE LAS CORRELACIONES ENTRE LAS MEDIDAS DE LOS TEJIDOS OBTENIDAS POR ULTRASONIDOS Y SUS HOMÓLOGAS DE LA CANAL DE BOVINOS

Xavier, C., Gonzales-Barron U. y Cadavez, V. A. P.
Centro de Investigação da Montanha (CIMO), ESA - Instituto Politécnico de Bragança.
Campus de Santa Apolónia, Bragança. Portugal. E-mail: vcadavez@ipb.pt

INTRODUCCIÓN

Glass (1976) empleó por primera vez el término meta-análisis para referirse al análisis estadístico de resultados de diferentes ensayos clínicos para evaluarlos conjuntamente. El meta-análisis es una metodología estadística de un conjunto de publicaciones, con el objetivo de agregar y de comparar los resultados obtenidos por diversos estudios sobre el mismo tema (Viechtbauer, 2010). Así, los estudios de meta-análisis permiten combinar los resultados de varios estudios y reconocer patrones en los resultados de trabajos independientes (Gonzales-Barron *et al.*, 2012). Los estudios de meta-análisis pueden ser utilizados para estimar el efecto promedio y las diferencias de los efectos de varios estudios. Los trabajos que estudian las correlaciones de las medidas espesor de la grasa subcutánea (EGS) y del área del músculo *Longissimus dorsi* (AML), obtenidas por ultrasonido y las medidas homólogas efectuadas en la canal, presentan resultados muy variables y por veces contradictorios. De hecho, las correlaciones de cada uno de los trabajos son estimaciones y por tanto son portadores de imprecisiones. En este trabajo presentamos los resultados de un estudio de meta-análisis, de 9 estudios empíricos publicados en revistas internacionales, realizado con el objetivo de estimar el efecto promedio de las correlaciones de varios estudios.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo de meta-análisis fue realizado con el paquete metafor (Viechtbauer, 2010) del software R (R Development Core Team, 2011). Para ello se utilizaron 9 artículos con información relativa a los coeficientes de correlación de Pearson entre las medidas de espesor de la grasa subcutánea (EGS) y del área del músculo *Longissimus dorsi* (AML) obtenidas por ultrasonido, a nivel de la 12-13ª costillas, en el animal vivo y las medidas homólogas efectuadas en la canal de bovinos. El tamaño del efecto promedio del coeficiente de correlación para las medidas EGS y AML fue determinado usando modelos de meta-análisis de correlaciones de efectos aleatorios y de efectos fijos basados en la transformación Z de Fisher. El sesgo de publicación fue evaluado por el gráfico de embudo, que es un diagrama de dispersión de las correlaciones estimadas *versus* el tamaño de muestra (n). Los estimados serán precisos cuando mayor fuera el tamaño de muestra. La existencia de heterogeneidad entre estudios fue evaluada por el índice I^2 que evalúa la proporción de la variación total que es atribuible a la heterogeneidad (Higgins and Thompson, 2002): $I^2 = \tau^2/(\tau^2 + \sigma^2)$ donde τ^2 corresponde a la variabilidad entre estudios y σ^2 a la variabilidad interna en los estudios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del meta-análisis para la medida EGS se presentan en la Figura 1. El tamaño del efecto medio presenta un valor elevado (0,78) y se puede considerar como significativa. Así, existe una relación elevada y positiva entre las medidas de EGS obtenidas por ultrasonido y las homólogas hechas en la canal. Se observó ausencia de homogeneidad en los estudios y cerca de 78% ($I^2 = 77,9\%$) de la variación total es atribuible a la heterogeneidad entre los estudios.

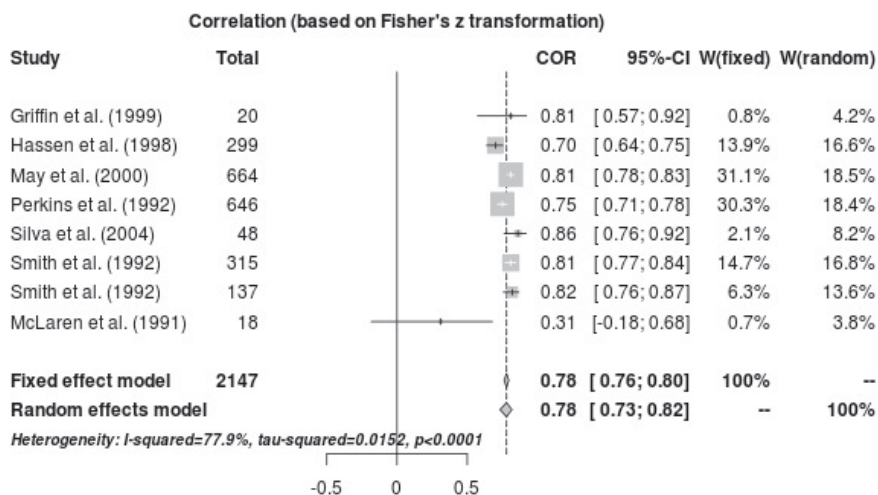


Figura 1. Resultados del meta-análisis para la medida EGS

Los resultados del meta-análisis para la medida AML se presentan en la Figura 2. El tamaño del efecto promedio presenta un valor de 0,54 que se puede considerar como significativo. Así, existe una relación elevada y positiva entre las medidas de AML obtenidas por ultrasonido y las homólogas efectuadas en la canal. Del mismo modo, se observó ausencia de homogeneidad entre estudios y cerca de 79% ($I^2 = 78,3\%$) de la variación total es atribuible a la heterogeneidad entre los mismos.

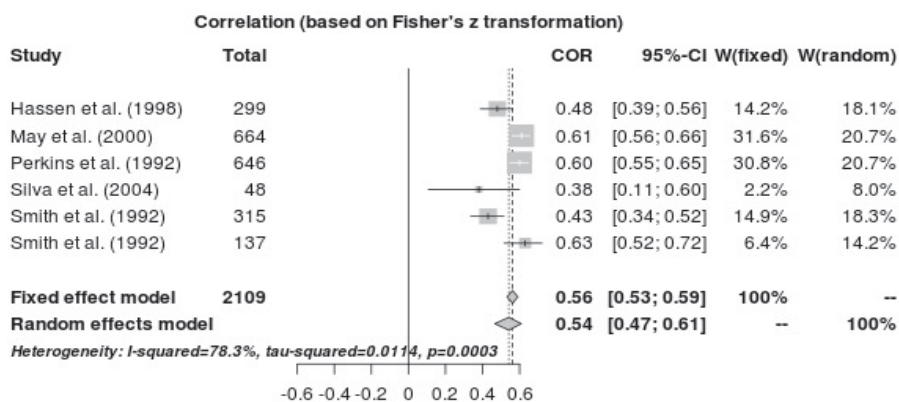


Figura 2. Resultados del meta-análisis para la medida AML

En ambas medidas (EGS y AML), se observó una elevada variabilidad entre estudios, y las correlaciones son influenciadas por efectos específicos de los estudios. Así, la variabilidad entre ellos se podrá corregir con la utilización de variables moderadoras que expliquen dicha heterogeneidad.

El presente estudio de meta-analisis confirmó las correlaciones positivas y significativas de las medidas de EGS y de AML, efectuadas por ultrasonido y las homólogas de la canal de bovinos. Los resultados contradictorios y variables resultan de condiciones específicas de los estudios como: raza y peso vivo de los animales y a los efectos de los operadores que realizan las mediciones de EGS y AML.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- G. V. Glass, Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research, Educational Researcher 5 (10) (1976) 3–8.
- W. Viechtbauer, Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package, Journal of Statistical Software 36 (3) (2010) 1–48, ISSN 1548-7660, URL <http://www.jstatsoft.org/v36/i03>.
- U. Gonzales-Barron, J. Sheridan, F. Butler, V. Cadavez, A meta-analytical assessment of the variability between abattoirs in the effect of chilling on the Salmonella incidence on pig carcasses, in: H.-C. Langowski, S. Franke (Eds.), 7th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry, EUROSIS-ETI, 80–87, 2012.
- R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.r-project.org>, ISBN 3-900051-07-0, 2011.
- J. P. T. Higgins, S. G. Thompson, Quantifying heterogeneity in a meta-analysis, Statistics in Medicine 21 (11) (2002) 1539–1558, ISSN 1097-0258, 10.1002/sim.1186, URL <http://dx.doi.org/10.1002/sim.1186>.

META-ANALYSIS STUDY OF CORRELATIONS BETWEEN CARCASS TISSUES MEASUREMENTS OBTAINED BY ULTRASOUND AND TAKEN ON THE CARCASS OF BOVINES

ABSTRACT: The objective of this work was to use meta-analysis to estimate the effect size of the correlations between carcass tissues measurements obtained by ultrasounds and taken on the carcass of bovines. Eight independent studies of correlations between carcass tissues measurements obtained by ultrasounds and taken on the carcass of bovines were used. In each study the correlations and the sample size were obtained and a correlations random-effects meta-analysis model was applied. The estimated correlations effect size was 0.78 (95% CI: 0.73-0.82), for the EGS measurement, and 0.54 (95% CI: 0.47-0.51), for the AML measurement, and the studies were heterogeneous for both carcass tissues measurements. These results confirmed the high and positive correlations between carcass tissues measurements obtained by ultrasounds and taken on the carcass of bovines.

Keywords: Bovines, Carcasses, Ultrasounds, Meta-analysis.

CAMBIOS EN LA COMPOSICION EN ÁCIDOS GRASOS DEL LECHÓN IBÉRICO LACTANTE

Badillo, I., Haro, A., Gómez-Carballar, F., Aguinaga, M.A., Nieto, R. y Aguilera, J. F.¹
¹ Instituto de Nutrición Animal, INAN, Estación Experimental del Zaidín, EEZ-CSIC. Cno. Del Jueves s/n. 18100-Armilla (Granada). E-mail: jose.aguilera@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Estudios previos muestran que el ritmo de crecimiento del lechón Ibérico lactante, comparativamente inferior al observado en lechones de razas convencionales, está relacionado con una baja eficiencia en el uso de la proteína y energía de la leche para la formación de tejidos; el índice de conversión energética observado, 23,9 kJ/g ganancia peso, es un 30% superior al descrito para lechones de genotipo convencional (Aguinaga *et al.*, 2011). Estos estudios también sugieren que el alto coste energético de la deposición de proteína es uno de los principales factores que contribuyen a esta baja eficiencia energética, al igual que ocurre en etapas posteriores de desarrollo de esta raza porcina (Nieto *et al.*, 2012). El crecimiento del lechón es consecuencia de la rápida acumulación que tiene lugar en su organismo de agua, proteína, grasa y minerales. Los cambios en composición corporal dan lugar a una reducción del contenido de agua, un moderado incremento del contenido de proteína y un rápido aumento de la concentración de grasa (de 2,6% al nacimiento a 12,5% al destete, Aguinaga *et al.*, 2011), esta última de vital importancia para el mantenimiento de la temperatura corporal durante los primeros días de vida. La acumulación de grasa corporal es el resultado neto del balance entre la grasa absorbida, procedente de la dieta (calostro y leche materna), la síntesis endógena de grasa y la lipólisis, fenómenos sobre los cuales el genotipo parece tener una clara influencia (Wood *et al.*, 2008). El objetivo del presente trabajo es analizar los cambios en composición en ácidos grasos (AG) que sufren distintos componentes corporales del lechón Ibérico, para profundizar en el estudio del proceso de deposición de grasa y su posible contribución a la baja eficiencia de utilización de la energía proporcionada por la leche durante la lactancia.

MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento experimental se describe en extenso en Aguinaga *et al.* (2011). Brevemente, se llevaron a cabo dos ensayos consecutivos, cada uno con ocho cerdas Ibéricas, de las que cuatro se utilizaron para determinar la producción de leche, analizar el crecimiento de los lechones y llevar a cabo pruebas de balance de nutrientes, y cuatro para realizar la toma de muestras de leche. La temperatura ambiental fue $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el primer ensayo y $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el segundo. El tamaño de la camada se igualó a seis lechones en el primer día tras el parto. Los lechones se pesaron individualmente al nacimiento y semanalmente a partir del día 5 de vida. Se recogieron muestras de leche los días 5, 12, 19, 26 y 34 tras el parto que se conservaron a -20°C hasta su análisis. Se procedió al sacrificio de un lechón por camada al nacimiento y de cuatro lechones por camada al inicio del día 35 de vida, previa anestesia mediante inyección intraperitoneal de 40 mg/kg PV de Pentotal sódico (Lab. Abbot, Madrid, España). Tras el desangrado, mediante disección se aislaron la canal eviscerada –dividida a su vez en canal y cabeza + patas + cola-, la sangre y las vísceras (incluyendo el tracto gastrointestinal vacío), que se pesaron y guardaron a -20°C hasta su análisis. Sobre este material finamente dividido y liofilizado se llevaron a cabo las correspondientes determinaciones analíticas. Se ha realizado el análisis de AG de muestras de leche, y de la canal y vísceras de 8 lechones al nacimiento, de una parte, y de los mismos componentes en dos lechones por camada ($n=16$), sacrificados con 35 días de edad. En cada muestra se realizó una extracción lipídica por el método de Folch modificado, la metilación de los AG resultantes de la extracción y la medida de los mismos en cromatógrafo de gases (Thermo Scientific, Focus GC, Rodano, Italia). Los resultados se analizaron mediante ANOVA por el procedimiento GLM de SAS para analizar el efecto de las réplicas de ensayo. Se utilizó el lechón como unidad experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aproximadamente un 90% de los AG totales de la leche de la cerda Ibérica está formado por los ácidos oleico, palmítico, linoleico, palmitoleico y esteárico, en orden decreciente de

concentración relativa, alcanzando los tres primeros en conjunto el 78% del total. Se observan diferencias significativas entre las dos réplicas del ensayo en las concentraciones relativas de los ácidos linoleico, esteárico y oleico (Tabla 1). En el lechón Ibérico recién nacido los ácidos C16:0, C18:1 n-9 y C18:0 presentan las concentraciones relativas más elevadas, tanto en canal como en vísceras (Tabla 2). En la canal de los lechones Ibéricos sacrificados al término de su lactación se observan diferencias estadísticas entre réplicas de ensayo para los ácidos C14:0, C16:1, C18:1 n-9, C18:2 n-6 y C18:3 n-3. A destacar la elevada proporción de C18:1 n-9, que aumenta drásticamente su concentración relativa respecto a la observada en la canal del lechón al nacimiento. Se produce en paralelo un marcado descenso en las proporciones de C18:0, y sobre todo, de 18:2 n-6. En cuanto a las vísceras, a lo largo de la lactación se produce un notable enriquecimiento relativo en los ácidos C16:1 n-9 y, sobre todo, en C18:1 n-9 y reducción de la concentración relativa de C18:0, es decir, tiene lugar un proceso de desaturación notable. Contrariamente a lo observado en la canal, no se produce modificación sensible en la concentración relativa de C18:2 n-6. La ausencia de AG de cadena media (presentes en la leche) en la canal y vísceras del lechón sugiere su utilización preferente como sustrato energético. Los cambios observados en la composición en AG en canal y vísceras de los lechones reflejan una importante modificación del perfil lipídico a lo largo de la lactación. El perfil de AG de las canales de los lechones sacrificados tras el destete presenta mayores proporciones relativas de AG saturados y monoinsaturados y menor riqueza de poliinsaturados que los descritos para lechones de genotipo convencional (Quelen *et al.*, 2010). La posible influencia de este perfil lipídico específico sobre la eficiencia de utilización de la energía metabolizable proporcionada por la leche materna será considerada, junto con otros aspectos, en trabajos en curso destinados a dilucidar esta cuestión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguinaga, M.A., Gómez-Carballar, F, Nieto, R. & Aguilera, J.F. 2011. *Animal* 5: 1390-1397.
- Nieto, R., Lara, L, Barea, R., García-Valverde, R., Aguinaga, M. A., Conde-Aguilera, J.A. & Aguilera, J.F. 2012. *J Anim Sci* 90: 3809-3820.
- Quelen, F., Boundry, G & Mourou, J. 2010. *Brit J Nut* 104: 533-543.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I. & Whittington, F.M. 2008. *Meat Sci* 78: 343-358.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Sánchez Romero Carvajal Jabugo, S.A. su valiosa colaboración. Este trabajo ha sido financiado por Junta de Andalucía (proyecto referencia AGR-395) y MINECO (proyecto referencia AGL2011-25360).

CHANGES IN FATTY ACID COMPOSITION OF SUCKLING IBERIAN PIGLETS

ABSTRACT: The present work is part of an experimental program aimed at determining metabolic causes for the lower growth and energetic efficiency of the suckling Iberian piglet when compared to conventional piglets. Sixteen pure-bred Iberian (IB) sows were used in two trials to determine milk nutrient utilization and piglet growth over a 34-d lactation period. Within each litter, equalized to six piglets, one piglet at birth and four piglets on d 35 of life were slaughtered. Fatty acid composition was determined on average milk samples and on carcass and viscera of 1-d and 35-d piglets. Oleic, palmitic, linoleic and palmitoleic acid, contributed to approximately 90% of total fatty acids in Iberian sow milk. At weaning, piglet whole-body fat content increased nearly 5 fold. At this point, in carcass there was a noticeable increase on oleic acid and a decrease on stearic and linoleic acid relative contents, meanwhile in viscera the relative proportions of palmitoleic and oleic acids increased. As a result, fatty acid profile in the weaned Iberian piglet differs from that described for leaner genotypes. The possible consequence of this issue upon energetic efficiency of sow milk nutrient utilization deserves further studies.

Keywords: fatty acid composition, carcass, Iberian piglet, sow milk

Tabla 1. Perfil medio de ácidos grasos (g/100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos) de leche de cerdas Ibéricas durante periodos de lactación de 34 días (media ± error estándar; n=4 por réplica de ensayo).

		Réplica 1	Réplica 2	P ¹ <
Ácido cáprico	C10:0	0,028 ± 0,002	0,031 ± 0,003	NS
Ácido láurico	C12:0	0,153 ± 0,009	0,191 ± 0,011	0,05
Ácido mirístico	C14:0	2,697 ± 0,053	3,415 ± 0,121	0,001
Ácido miristoleico	C14:1	0,141 ± 0,010	0,197 ± 0,014	0,01
Ácido palmítico	C16:0	29,30 ± 1,27	32,45 ± 0,42	= 0,08
Ácido palmitoleico	C16:1 n-9	7,361 ± 0,426	7,990 ± 0,341	NS
Ácido esteárico	C18:0	4,464 ± 0,061	4,752 ± 0,121	0,05
Ácido oleico	C18:1 n-9	39,23 ± 1,44	35,15 ± 0,72	0,05
Ácido vaccénico	C18:1 n-7	2,741 ± 0,195	2,458 ± 0,048	NS
Ácido linoleico	C18:2 n-6	9,231 ± 0,180	9,903 ± 0,194	0,05
Ácido linoléico	C18:3 n-3	0,633 ± 0,013	0,650 ± 0,018	NS
Ácido eicosaenoico	C20:1 n-9	0,437 ± 0,034	0,400 ± 0,021	NS
Ácido araquidónico	C20:4 n-6	0,477 ± 0,036	0,424 ± 0,019	NS

¹NS: No significativo

Tabla 2. Perfil medio de ácidos grasos (g/100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos) en canal y vísceras de lechones Ibéricos recién nacidos (n=8) o sacrificados tras 34 días de lactancia (n=8 por réplica).

	Composición al nacimiento	Composición a 35 días de edad		P ¹ <
		Réplica 1	Réplica 2	
Canal				
C14:0	4,14 ± 0,21	2,380 ± 0,055	3,090 ± 0,280	0,05
C16:0	31,76 ± 0,34	33,90 ± 0,40	34,55 ± 0,67	NS
C16:1 n-9	6,89 ± 0,31	6,74 ± 0,15	8,27 ± 0,19	0,001
C18:0	11,54 ± 0,57	7,00 ± 0,20	6,56 ± 0,35	NS
C18:1 n-9	26,53 ± 0,22	43,07 ± 0,47	39,81 ± 0,60	0,01
C18:1 n-7 cis 11	7,29 ± 0,18	4,20 ± 0,10	4,16 ± 0,10	NS
C18:2 n-6	4,74 ± 0,21	0,884 ± 0,070	1,860 ± 0,258	0,01
C18:3 n-3	0,064 ± 0,008	0,018 ± 0,003	0,034 ± 0,005	0,05
C20:1 n-9	0,372 ± 0,017	0,623 ± 0,036	0,525 ± 0,077	NS
C20:4 n-6	0,098 ± 0,010	0,033 ± 0,005	0,048 ± 0,009	NS
Vísceras				
C14:0	2,08 ± 0,15	1,736 ± 0,051	2,098 ± 0,054	0,001
C16:0	30,64 ± 0,43	32,18 ± 0,34	32,83 ± 0,28	NS
C16:1 n-9	3,90 ± 0,68	5,35 ± 0,17	6,74 ± 0,14	0,001
C18:0	14,97 ± 0,48	11,86 ± 0,33	11,48 ± 0,46	NS
C18:1 n-9	25,67 ± 1,13	36,12 ± 0,65	33,96 ± 0,55	0,05
C18:1 n-7 cis 11	6,53 ± 0,32	3,92 ± 0,13	3,95 ± 0,08	NS
C18:2 n-6	6,31 ± 0,66	5,63 ± 0,18	6,01 ± 0,21	NS
C18:3 n-3	0,167 ± 0,037	0,133 ± 0,010	0,131 ± 0,005	NS
C20:1 n-9	0,415 ± 0,014	0,515 ± 0,018	0,440 ± 0,014	0,01
C20:4 n-6	6,46 ± 0,35	1,11 ± 0,12	1,12 ± 0,10	NS

¹Comparación entre réplicas de ensayo; NS: No significativo

EFFECTO DEL AYUNO HASTA 34 °C DÍA EN LA CALIDAD INSTRUMENTAL DE LA CARNE DE TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

López-Luna, J.¹ y Villarroel, M.

¹Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040, Madrid.

E-mail: javier.lopezl@upm.es

INTRODUCCIÓN

El ayuno previo al sacrificio es una práctica común en acuicultura pero la duración óptima de este ayuno ha suscitado un gran interés en los últimos años, tanto en la acuicultura marina (Mørkøre *et al.*, 2008) como de agua dulce (Barcellos *et al.*, 2010), incluyendo la trucha arco iris (FAWC, 1996). El ayuno previo a un procedimiento estresante, como el transporte o el sacrificio, permite el vaciado del aparato digestivo y reduce la demanda de oxígeno y la producción de desechos (Robb, 2008). Sin embargo, también parece incrementar los niveles de estrés, afectando de esta manera a los procesos bioquímicos *post mortem*, principalmente la glucólisis anaerobia y el ritmo de degradación del ATP. Esto puede a su vez influenciar el inicio y el desarrollo del *rigor mortis* y la frescura del producto final (Poli *et al.*, 2005). Igualmente, se ha demostrado que la tasa de deterioro de la carne depende de varios factores entre los que se incluye la cantidad de alimento presente en los intestinos (Macagnano *et al.*, 2005), por lo que reduciendo esta cantidad es posible minimizar el deterioro y aumentar la vida útil del producto final (Huidobro y Tejada, 2004). Sin embargo, la duración adecuada del ayuno sin que la calidad de la carne se vea comprometida no está clara. Aunque existen diversas recomendaciones que estiman un límite máximo de 48 h (FAWC, 1996), es habitual para la trucha en libertad soportar periodos de privación de alimento más largos. Además, se ha demostrado que el ayuno a largo plazo es capaz de mejorar la calidad de carne (Einen y Thomassen, 1998), pero los efectos a corto plazo se desconocen. Actualmente no existe uniformidad a la hora de definir una hora óptima de sacrificio en trucha arco iris y menos en relación a la calidad del producto final. Sin embargo, la elección de este momento es de una gran importancia, ya que está determinada por los ritmos diarios de parámetros fisiológicos de estrés, afectando de esta manera a las propiedades de la carne.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la Piscifactoría de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes (UPM, Madrid). Se dispuso de 2 raceways de 5,16 m³ de capacidad que disponían de agua proveniente de un pozo, proporcionando un flujo de agua constante. Se usaron 180 truchas arco iris macho de 417,7±61,3 g de peso inicial (±sd). Cuando las truchas llegaron a las instalaciones, se dividieron de forma aleatoria entre los dos raceways (n=90), donde se alojaron durante 2 semanas (período de adaptación). Al finalizar este período, los raceways se dividieron físicamente en tres secciones de 1,72 m³ con 30 animales en cada sección, pasando otras 2 semanas en estas condiciones. A cada sección se le asignó una hora de sacrificio (08h00, 14h00 y 20h00) y dentro de cada sección los animales se ayunaron durante 1, 2 o 3 días dependiendo del día en el que se sacrificaran (primero, segundo o tercer día). En el otro (controles), las truchas fueron sacrificadas a las mismas horas pero no ayunadas. Los animales fueron sometidos a un fotoperíodo natural (orto: 07h40; ocaso: 19h12). La temperatura del agua media fue de 11,1±0,6 °C. Para el cálculo de los °C día, la temperatura del agua se midió cada 5 min, resultando un total de 11,5, 22,9 y 34,1 °C día. Después de 1, 2 o 3 días de ayuno, se capturaron individualmente 10 animales ayunados y 10 controles de cada sección de forma alternativa, se anestesiaron con aceite de clavo, se pesaron y finalmente se sacrificaron. A continuación, cinco peces de cada grupo (ayunados y controles) fueron fileteados para proceder a los análisis de pH y capacidad de retención de agua, mientras que los otros cinco se mantuvieron intactos y se almacenaron a 4 °C para los análisis de *rigor mortis*. El pH muscular se midió a las 0, 2, 9, 24, 48 y 72 h *post mortem* y la cantidad de agua liberada (PWR), según el método de Grau y Hamm (1957) a las 0, 24, 48 y 72 h *post mortem*. La progresión del *rigor mortis* se midió a las 0, 2, 9, 24, 48 y 72 h de almacenamiento de acuerdo al método de Cuttinger (Korhonen *et al.*, 1990). Para el análisis de calidad de la carne se realizó un análisis de medidas repetidas mediante el programa SAS (Statistical

Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA), utilizando la duración del ayuno y la hora de sacrificio como factores principales y las horas *post mortem* como variable intra-sujeto. Para simplificar el análisis, los tres grupos control (días 1, 2 y 3) se combinaron en un solo grupo, teniendo de esta manera cuatro grupos (0, 1, 2 y 3 días de ayuno). Las medias, incluyendo las interacciones, se compararon mediante un test LSD con un 5% como nivel de significación ($P < 0,05$). En caso de que la interacción triple (duración del ayuno*hora de sacrificio*horas *post mortem*) fuese significativa ($P < 0,05$), se analizarán las diferencias de las cuatro duraciones de ayuno en cada hora *post mortem* (análisis de una vía, nivel de significación: 5%) por cada hora de sacrificio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de medidas repetidas mostró un efecto significativo de la interacción hora de sacrificio*duración del ayuno*horas *post mortem* ($P < 0,01$). En líneas generales, no hubo diferencias importantes entre duraciones del ayuno u horas de sacrificio (Figuras 1 y 2). El pH muscular mostró una tendencia a disminuir a partir de las 24 h *post mortem*, con una mayor variabilidad en animales sacrificados a las 20h00. Igualmente, las truchas ayunadas durante 3 días muestran valores más altos de pH durante todo el período de almacenamiento. Esto puede deberse a que la privación de alimento provoca una reducción del metabolismo muscular (Mørkøre *et al.*, 2008) y por tanto hay una menor cantidad de energía disponible para mantenimiento. Además, puede existir un estrés asociado a múltiples causas, por el cual se agotarían las reservas de glucógeno del pez y consecuentemente se produciría una menor cantidad de ácido láctico (Newton y Gill, 1981). El máximo nivel de rigor se produjo a las 24 h *post mortem*. Contrariamente al pH, solo se registraron diferencias entre duraciones de ayuno a partir de las 9 h *post mortem*, con valores muy similares a las 0 y 2 h, lo que implica que el rigor comienza a partir de las 2 h y que entre las 2 y 9 h después del sacrificio ocurren una serie de procesos bioquímicos que causan los cambios posteriores, lo que puede estar relacionado con el ayuno. Con respecto a la PWR, se mantuvo estable, en un rango del 5-10%, lo que indica que es independiente del pH muscular, que varió en mayor medida, y podría estar más relacionado con la degradación estructural de la carne tal y como han demostrado otros autores (Olsson *et al.*, 2003). En cualquier caso, otros factores pueden haber influido en la falta de diferencias entre tratamientos, como la heterogeneidad en la medición de la capacidad de retención de agua o la temperatura de almacenamiento (Sigholt *et al.*, 1997). En conclusión, el ayuno hasta 34.1 °C y la hora de sacrificio no mostraron efectos importantes en la evolución de la calidad de la carne de trucha arco iris. En cualquier caso, el factor determinante en estos cambios parece ser el tiempo de almacenamiento. Además, las mayores diferencias en truchas sacrificadas a las 20h00 parecen demostrar que el sacrificio a esa hora puede entrañar mayores niveles de estrés, aunque en esta prueba no se midieron indicadores específicos de bienestar. Es necesaria mayor investigación para determinar las posibles relaciones entre el estrés previo al sacrificio y el ayuno a diferentes horas del día y con diferentes temperaturas de agua para comprender de que manera los cambios bioquímicos en la carne afectan al manejo pre-sacrificio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barcellos, L., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R.M. & Ferreira, D. 2010. *Aquaculture* 300: 231-236.
- Macagnano, A., Careche, M., Herrero, A., Paolesse, R., Martinelli, E., Pennazza, G., Carmona, P., D'Amico, A. & Di Natale, C. 2005. *Sensor. Actuator. B* 111-112: 293-298.
- Einen, O. & Thomassen, M.S. 1998. *Aquaculture* 169: 37-53.
- Farmed Animal Welfare Council, FAWC. 1996. Report on the Welfare of Farmed Fish. <http://www.fawc.org.uk/reports/fish/fishrtoc.htm>.
- Grau, R. & Hamm, R. 1957. *Z. Lebensm. Unters. For.* 105: 446-460.
- Huidobro, A. & Tejada, M. 2004. *J. Sci. Food Agr.*, 84: 1405-1413.
- Korhonen, R.W., Lanier, T.C. & Giesbrecht, F. 1990. *J. Food Sci.* 55: 346-349.
- Mørkøre, T., Mazo, P.I., Tahirovic, V. & Einen, O. 2008. *Aquaculture* 277: 231-238.
- Newton, K.G. & Gill, C.O. 1981. *Meat Sci.* 5: 223-232.
- Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F. & Zampacavallo, G. 2005. *Aquacult. Int.* 13: 29-49.
- Olsson, G.B., Olsen, R.L., & Ofstad, R. (2003). *Food Sci. Technol.* 36: 125-133.
- Robb, D.H.F., Kestin, S.C. & Warris, P.D. 2000. *Aquaculture* 182: 261-269.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, S., Johansen, S., Nordtvedt, T.S. & Seland, A. 1997. *J. Food Sci.* 62: 898-905.

Agradecimientos: Esta prueba ha sido financiada por el proyecto AGL2010-19479.

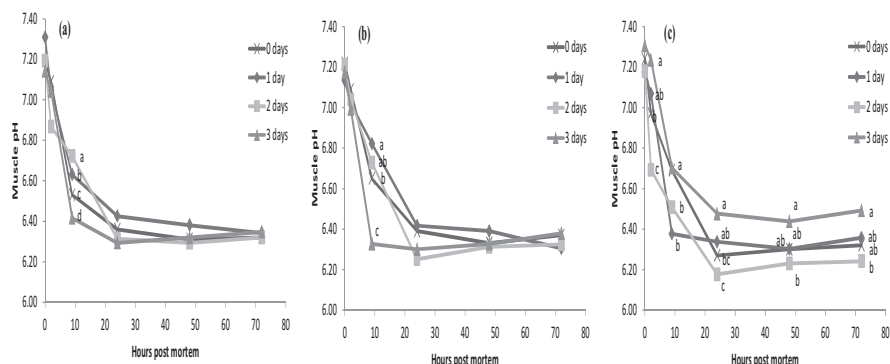


Figura 1. Evolución del pH muscular de trucha arco iris sacrificadas a las 08h00 (a), 14h00 (b) y 20h00 (c) durante 72 h de almacenamiento. Los puntos representan las medias ($n=5$ para ayunados y $n=15$ para controles; $SEM=0,07$). Las diferencias entre días de ayuno se representan con letras (ANOVA, $P<0,0001$).

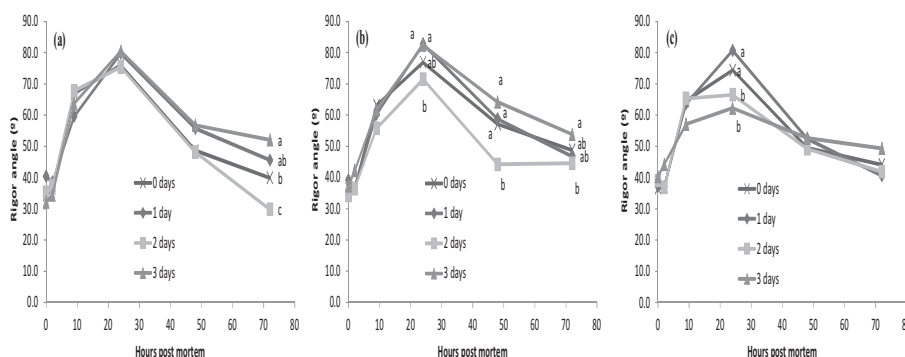


Figura 2. Evolución del rigor mortis en carne de trucha arco iris sacrificadas a las 08h00 (a), 14h00 (b) y 20h00 (c) durante 72 h de almacenamiento. Los puntos representan las medias ($n=5$ para ayunados y $n=15$ para controles; $SEM=3,5$). Las diferencias entre días de ayuno se representan con letras (ANOVA, $P<0,0001$).

EFFECT OF FASTING UP TO 34^o C DAYS IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) ON INSTRUMENTAL MEAT QUALITY

ABSTRACT: Pre-slaughter handling of fish can have important effects on stress, although few studies have related fasting duration with water temperature and meat quality in trout. In this study, 90 rainbow trout were fasted for 1, 2 and 3 days (11.5, 22.9 and 34.1 °C days, respectively) and slaughtered at 08h00, 14h00 and 20h00 to observe the effect of fasting duration and hour of slaughter on instrumental meat quality indicators up to 72 h *post mortem*. The values of the fasted fish were compared with 90 control fish kept under similar conditions but not fasted. Results indicate that the interaction between fasting, hour of slaughter and storage time had a significant effect on pH, rigor and water holding capacity, although differences were small. Overall, these results suggest that fasting up to 34 °C days has little effect on meat quality.

Keywords: pH, fasting, trout, rigor.

ACTITUDES DE LOS CONSUMIDORES Y PRODUCTORES HACIA LA CARNE DE CORDERO DE RAZA OJINEGRA DE TERUEL.

Fortea C., Maza¹ M.T. y Gracia A.

¹ Dpto. de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. mazama@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El objetivo del estudio es analizar las actitudes de los consumidores y productores hacia la carne de cordero de raza Ojinegra de Teruel. En concreto, se estudia si diferentes características de la carne de cordero procedente de esta raza son igualmente valoradas por estos dos agentes de la cadena agroalimentaria o, por el contrario uno valora más algunos de los aspectos y el otro valora más otros. Los resultados permiten ayudar a definir las estrategias de comunicación y marketing de la carne procedente de esta raza autóctona para conseguir un buen posicionamiento en el mercado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención de los datos se realizó una entrevista personal dirigida a una muestra de 399 compradores habituales de alimentos residentes en la ciudad de Zaragoza y 34 productores de cordero de raza Ojinegra de Teruel. El muestreo para los consumidores fue aleatorio y estratificado por edad y barrios, con un error de muestreo del $\pm 5\%$ ¹, y para los productores, de conveniencia, habiéndose encuestado al 63% de los productores (54).

Para medir las actitudes de los consumidores y productores hacia la carne de cordero de raza Ojinegra de Teruel, el cuestionario administrado incluía una pregunta en la que los encuestados debían indicar, en una escala de 1 a 5, en qué medida asociaban esta carne de cordero con una serie de aspectos (Tabla 1) donde 1 indica ninguna asociación, 2 poca asociación, 3 asociación media, 4 bastante asociación y 5 alta asociación. Para contrastar si la valoración asignada por los consumidores y productores a cada uno de los aspectos era similar o, por el contrario difería entre ellos se utilizó un test no paramétrico para dos muestras independientes. En concreto, se usó el test U de Mann-Whitney debido a que el número de encuestados de cada muestra era muy distinto, ya que el grupo de consumidores era casi 13 veces mayor que el de los productores (Glantz, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La descripción de las características socio-demográficas de la muestra de consumidores y de productores de cordero de raza Ojinegra se presenta en el Tabla 2.

Los resultados obtenidos sobre las actitudes de los consumidores y productores de la carne de cordero de raza Ojinegra de Teruel indican que los consumidores asignan puntuaciones bastante bajas a todos los aspectos, en la mayoría de los casos inferiores a 3, mientras que los productores ofrecen puntuaciones más altas para todos los aspectos salvo para la afirmación "es igual que la que procede de otras razas". Los aspectos más valorados por los consumidores son, "tiene una calidad superior" (3.1) seguida por "ofrece una mayor seguridad alimentaria al ser alimentada con pasto casi exclusivamente" (2,9) y "es una carne con más consistencia debido a la zona escarpada en la que se cría" (2,9). Por el contrario, los consumidores asignan menor valoración a "son carnes menos caras debido a que se suplementan ocasionalmente" (2,3) y "es igual que la que procede de otras razas" (2,4).

Por otra parte, los aspectos mejor valorados por los productores son "favorece el desarrollo rural (4,0), "es una raza que da trabajo en zonas desfavorecidas" (4,0) y "tiene una calidad superior" (3,8). Los aspectos menos valorados coinciden con los señalados por los consumidores siendo el menos importante "es igual que la que procede de otras razas" (2,2) y "son carnes menos caras debido a que se suplementan ocasionalmente" (2,6). Por tanto existe una coincidencia en los aspectos menos valorados por productores y consumidores, mientras

¹ Para un población infinita, un nivel de confianza del 95% ($k = 2$) y un p y q iguales a 0,5

que los aspectos más valorados difieren, valorando más los consumidores aquellos aspectos relacionados con la calidad y seguridad alimentaria, y los productores los aspectos económicos y sociales, como dar trabajo y favorecer el desarrollo de zonas rurales de Teruel.

Por otra parte, los resultados indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las valoraciones asignadas por los consumidores y productores para todos los aspectos excepto para la afirmación “es igual que la que procede de otras razas” (Tabla 1). Además, es interesante remarcar, que es precisamente este último aspecto el único que ha sido menos valorado por ambos agentes de la cadena. La poca asociación con esa afirmación indicaría la aceptación de la singularidad de esa carne por ambos eslabones.

Si bien los resultados deber ser tomados con cierta cautela dado el desconocimiento que en general presentaban los consumidores sobre esta raza, parece deducirse que cualquier campaña de comunicación dirigida a potenciar el consumo de esta carne debería tener como eje fundamental la calidad y la seguridad alimentaria, utilizando como segundo eje motivacional de compra las ventajas que el desarrollo de la raza pueda tener para el mundo rural. Como han señalado Barreira et al. (2009), el estudio de cómo los consumidores perciben la calidad de los productos ofertados por los integrantes de la cadena es de crucial importancia para todos los actores involucrados, siendo fundamental para la organización de una cadena orientada al mercado (Barreiro, 2003; Brunso et al., 2002; De Carlos, 2007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barreira, M.M., Brandao, A.R.W., Lemos, J.P.C., & Aguiar Fontes, M. (2009). Quality perception of PDO beef producers. *Agric. Econ.Rev.*, 10 (2): 36-49.
- Barreiro, D. (2003). Las marcas de calidad en el sector vacuno. *Eurocarne*, 117: 103-121.
- Brunso, K., Ahle Fjord, T., & Grunert, K.G. (2002) Consumers food choice and quality perception. Aarhus V., Denmark: The Aarhus School of Business.
- De Carlos, P. (2007). Estudio integral del análisis de la calidad y seguridad alimentaria con el fin de definir acciones estratégicas por parte de la industria agroalimentaria. España: Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid.
- Glantz, S.A. (2006). *Bioestadística (6ª Ed.)*, Mexico: McGraw-Hill Interamericana.

Agradecimientos: a la Asociación de Ganaderos de Raza Ojinegra de Teruel (AGROJI), que permiten con su trabajo que esta raza se conserve y se mantenga.

Tabla 1. Actitudes de los consumidores y productores hacia la carne de cordero de la raza Ojinegra de Teruel (puntuaciones medias) y test de U de Mann-Whitney.

	Consumidores	Productores	p-valor
Es una carne con más consistencia debido a la zona escarpada en la que se cría	2,9 (2)	3,3 (4)	0,015
Es igual que la que procede de otras razas	2,4 (5)	2,2 (6)	0,384
Tiene una calidad superior	3,1 (1)	3,8 (2)	0,004
Ofrece una mayor seguridad alimentaria al ser alimentada con pasto casi exclusivamente	2,9 (2)	3,4 (3)	0,017
Favorece el desarrollo rural de diferentes zonas rurales de Teruel	2,6 (4)	4,0 (1)	0,000
Es una raza que da trabajo en zonas desfavorecidas	2,7 (3)	4,0 (1)	0,000
Son carnes menos caras debido a que se suplementan ocasionalmente	2,3 (6)	2,6 (5)	0,005

Nota: los valores en paréntesis indican el ranking de la valoración de los diferentes aspectos para consumidores y productores.

Tabla 2. Características socio-demográficas de la muestra de consumidores y productores (% , salvo indicación).

	Consumidores	Productores
Tamaño de la muestra	339	34
Edad (media y desviación típica)	48,8 (14,9)	52,3 (9,1)
de 20 a 39 años	36,4%	8,8%
de 40 a 59 años	31,8%	64,7%
más de 59 años	31,8%	26,5%
<i>Tamaño familiar (media y desviación típica)</i>	3,2 (1,3)	3,4 (1,3)
<i>Renta familiar</i>		
Menos de 1.500€/mes	19,8%	n.d.
Entre 1.501 y 2.500€/mes	35,1%	n.d.
Entre 2.501 y 3.500€/mes	31,3%	n.d.
Más de 3.501€/mes	13,8%	n.d.
<i>Nivel de estudios</i>		
Primarios	46,6%	73,5%
Secundarios	30,6%	26,4%
Universitarios	22,8%	0,0%
<i>Sexo</i>		
Hombre	24,3%	100%
Mujer	75,7%	0%

n.d.: no disponible.

CONSUMERS' AND PRODUCERS' ATTITUDES TOWARDS THE "OJINEGRA FROM TERUEL" LAMB MEAT

ABSTRACT: The aim of this paper is to study consumers' and producers' attitudes towards lamb meat from a locally produced breed "Ojinegra from Teruel". Data come from a survey administrated face-to-face to a representative sample of consumers living in the town of Zaragoza and to a sample of 63% "Ojinegra from Teruel" lamb meat producers. Producers showed more positive attitudes towards this type of lamb meat than consumers. Both consumers and producers believed to a lesser extent that this type of meat is similar and more expensive than the lamb meat from other breeds. Consumers highly assessed those aspects related to the quality and food safety of the lamb meat while producers valued the socio-economic benefits for the rural area where the lamb meat is produced. The fact that both consumers and producers believed to a lesser extent that the lamb meat from the "Ojinegra from Teruel" is similar to the lamb meat from other breeds indicates that both stakeholders considered this breed as a singular attribute of the lamb meat. Then, "Ojinegra from Teruel" producers could use this attribute to differentiate their lamb meat in the Zaragoza market as long as consumers in this market seem to appreciate the difference.

Keywords: Attitudes, Aragón, Ojinegra from Teruel, stakeholders.

ESTUDIO DE CONSUMIDORES EN LABORATORIO Y HOGAR: DOS ESTRATEGIAS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE CARNE EN PEQUEÑOS RUMIANTES

Guerrero A.¹, Campo MM.¹, Cilla I.¹, Olleta JL.¹, Alcalde MJ.², Horcada A.² y Sañudo C.¹

¹ Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza.*
aguerre@unizar.es

² Área de Ciencias Agroforestales, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, Spain.

INTRODUCCIÓN

A pesar de su importancia a nivel mundial (920 millones de cabezas), los estudios sobre la especie caprina no son muy abundantes. España es uno de los países europeos con mayor censo en esta especie (3 millones de cabezas) representando el 17% del censo de la Unión Europea. Generalmente sus sistemas de producción son tradicionales y sostenibles, desempeñando también una labor social de fijación de la población rural. Por otra parte, el ganado caprino es la única especie de rumiantes que no tiene ninguna marca, salvo la etiqueta de calidad “Chivo Lechal Malagueño” de reciente obtención. Para estudiar la valoración que hacen los consumidores de un producto existen diversos métodos (Boutrolle *et al.*, 2007), pero la comparación directa entre ellos relacionada con la calidad de carne en rumiantes apenas ha sido estudiada todavía. Por tanto, el objetivo de este trabajo es conocer la aceptación de la carne de caprino por el consumidor valorada bajo dos condiciones de análisis diferentes (laboratorio y casa), comparando a su vez distintas razas caprinas con carne ovina de calidad, amparada bajo una IGP, la cual se consideró como producto de referencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 60 machos, lechales, pertenecientes a 5 razas caprinas y 1 ovina ($n=10$ animales por raza). De dichas razas, 4 fueron de aptitud cárnica: Moncaína (MO), Pirenaica (PI), Negra Serrana (NS) y Blanca Celtibérica (BC), y dos lecheras: Murciano-Granadina (MG) y la raza ovina Churra (CH) (IGP “Lechazo de Castilla y León”). Los animales fueron sacrificados a pesos comerciales en mataderos próximos a la zona de cría de cada raza y posteriormente trasladados refrigerados a Zaragoza, donde se muestrearon (Sañudo *et al.*, 2012). Se extrajo el músculo *Longissimus dorsi* de la media canal izquierda, así como las dos piernas de cada animal, muestras que se envasaron al vacío, maduraron durante 3 días y se congelaron hasta el momento de realizar las pruebas. Cada uno de los 119 consumidores que participaron en el análisis en laboratorio probó una porción (2x2 cm) de LD cocinada al grill de cada una de las seis razas a valorar. Este análisis se realizó en grupos de 8 personas, mediante un diseño equilibrado de las muestras (Macfie *et al.*, 1989) y en condiciones controladas (cabinas individuales para análisis sensorial). En cada muestra se valoró la aceptabilidad de la terneza, flavor, y la global de la carne, en una escala de 9 puntos: (1 me desagrada extremadamente – 9 me gusta extremadamente). En el hogar participaron 20 familias voluntarias, a las que semanalmente se les proporcionó una pierna congelada, en un orden variable según cada hogar. Se les pidió que preparasen las piernas asadas y con el mínimo condimento posible, siempre igual en cada grupo familiar, y tras descongelarlas la noche previa al cocinado a 4°C. Los tres atributos a valorar fueron los mismos que en laboratorio, utilizando una escala lineal de 10 cm: (1 me disgusta extremadamente - 10 me gusta extremadamente). En ninguno de los dos análisis se comentó que entre las muestras de caprino se encontraba una de ovino. Esta última escala se reconvirtió a 9 puntos para facilitar la comparación de datos entre ambos métodos. Se estudió el efecto de la raza mediante análisis de la varianza, GLM, utilizando el paquete estadístico SPSS (v.15.0). Las diferencias entre medias se determinaron con un test de Duncan. También se realizó un análisis de componentes principales para cada test de consumidores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis realizado en laboratorio, hubo diferencias significativas entre razas tanto en flavor ($p<0,01$) como en terneza y aceptación global ($p<0,001$), siendo las razas MG, MO, NS y CH las que obtuvieron una mayor aceptación global (Tabla 1).

En el hogar no hubo diferencias entre razas para el flavor, en cambio sí se mantuvieron las relacionadas con terneza ($p < 0,01$) y aceptabilidad global ($p < 0,05$), siendo de nuevo las razas más valoradas la CH, MG y MO junto con la BC (Tabla 1). Las puntuaciones obtenidas en el hogar fueron entre 0,15-0,96 puntos superiores a las obtenidas en laboratorio, probablemente debido a factores del tipo: modo de cocinado, [ya que produce cambios en las propiedades sensoriales de la carne (Sañudo *et al.*, 1998)], momento de consumo, presencia de otros comensales, así como cantidad de muestra valorada (Boutrolle *et al.*, 2007).

El análisis de componentes principales muestra como en condiciones de laboratorio la aceptabilidad se encuentra más correlacionada con la calidad del flavor que con la de la terneza ($r = 0,856$ vs. $0,844$), contrario a lo que ocurre en condiciones del hogar ($r = 0,970$ vs. $0,830$) donde se le da más importancia a la calidad de la terneza que a la del flavor. En ambas graficas (Figuras 1 y 2) las razas más próximas al atributo aceptabilidad global, así como al de la terneza fueron la MG, MO y CH, siendo las posiciones relativas de todas las razas respecto al eje 1 muy similar en ambas pruebas. Sin embargo, la raza NS, en condiciones de laboratorio obtuvo valores altos de flavor y terneza, contrariamente a en el hogar. Las razas NS y PI, que fueron las menos aceptadas, se sacrificaron a mayor peso, estando este factor inversamente relacionado con la terneza de la carne en caprino (Ripoll *et al.*, 2012). La MG fue la raza más ligera y con mayor engrasamiento canal (covariado por peso) siendo a su vez la de mayor aceptabilidad, demostrando la relación positiva entre ambos parámetros.

Al comparar los datos entre los dos métodos de la prueba de consumidores y debido a la similitud de resultados, se podrían considerar ambos como apropiados para conocer la aceptación de la carne de pequeños rumiantes. Se podría concluir que los consumidores aprecian diferencias entre distintas razas, aptitudes o sistemas de producción en caprino, pero que estas diferencias no son un aspecto negativo respecto a carne de cordero amparada bajo IGP, pudiendo tener el cabrito una aceptación y calidad sensorial similar a la del cordero de calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Macfie, H.J., Bratchell, N., Greenhoff, K. & Vallis, L.V. (1989). *J. Sens. Stu.* 4: 129-148 ● Boutrolle, I., Delarue, J., Arranz, D., Rogeaux, M. & Köster E.P. (2007). *Food Qual. Prefer.* 18: 490-499 ● Ripoll, G., Alcalde, M.J., Horcada, A., Campo M.M., Sañudo, C., Teixeira, A. & Panea, B. (2012). *Meat Sci.* 92: 62-70. ● Sañudo, C., Sánchez, A. & Alfonso, M. (1998). *Meat Sci.* 49: S29-S64. ● Sañudo, C., Campo, M.M., Muela, E., Olleta, J.L., Delfa, R., Jimenez-Badillo, R., Alcalde, M.J., Horcada, A., Oliveira, I., & Cilla, I. (2012). *Span. J. Agric. Res.* 10,690 - 700.

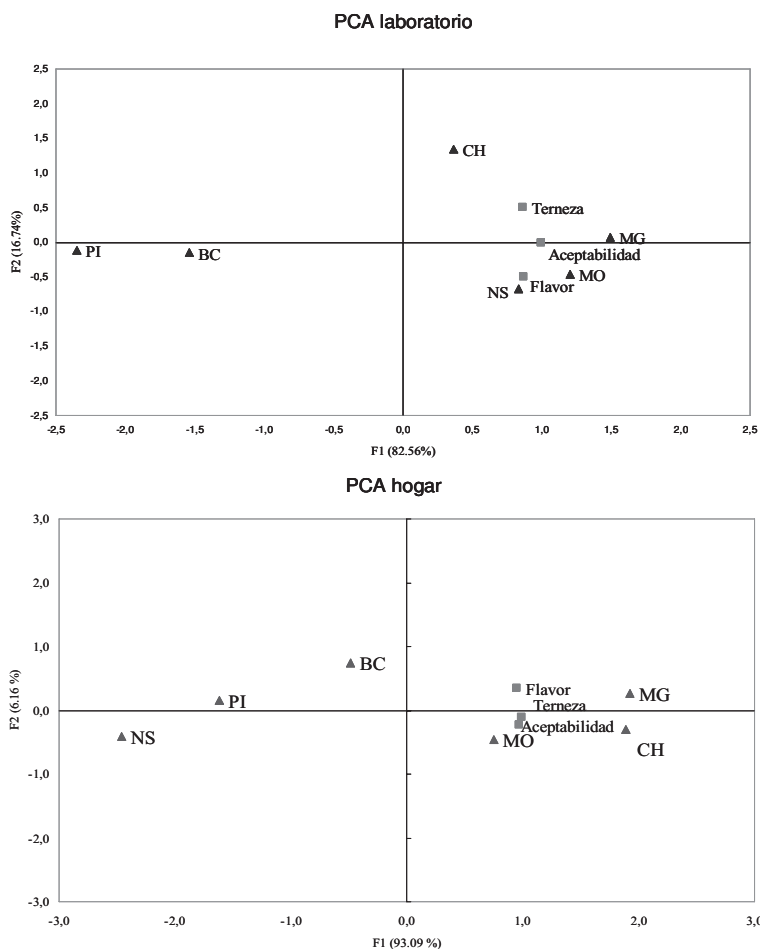
Agradecimientos: A la CICYT por su financiación (AGL2005-0577-C02-01/GAN) y a las asociaciones de ganaderos, FEAGAS, por su apoyo técnico.

Tabla 1. Efecto de la raza en la aceptación general de carne de pequeños rumiantes evaluada mediante análisis de consumidores en laboratorio ($n = 119$) y en hogar ($n = 70$).

	MO	PI	CH	MG	NS	BC	e.e.d.	Sig.
Aceptabilidad lab.	6.48 ^b	5.66 ^a	6.29 ^b	6.68 ^b	6.45 ^b	5.81 ^a	0.314	***
Aceptabilidad hogar	6.97 ^{ab}	6.62 ^a	7.07 ^b	6.99 ^{ab}	6.60 ^a	6.72 ^{ab}	0.155	*

e.e.d: error estándar de la diferencia. *: $p \leq 0.05$; ***: $p \leq 0.001$; MO =Moncaína; PI =Pirenaica; CH =Churra; MG =Murciano Granadina; NS =Negra Serrana; BC =Blanca Celtibérica.

Escala de 9 puntos



Figuras 1 y 2. Análisis de componentes principales (test de consumidores en laboratorio y en hogar). MO =Moncaína; PI =Pirenaica; CH =Churra; MG =Murciano Granadina; NS =Negra Serrana; BC =Blanca Celtibérica

CONSUMERS' STUDY UNDER LABORATORIAL AND HOME CONDITIONS: TWO STRATEGIES TO EVALUATE MEAT QUALITY IN SMALL RUMINANTS

ABSTRACT: Meat of 60 sucking males from 5 Spanish goat breeds ($n=10$ each) (Moncaína: MO; Pirenaica: PI; Negra Serrana: NS and Blanca Celtibérica: BC meat purpose, and Murciano-Granadina: MG, dairy purpose) and 10 from Churra (CH) dairy ovine breed with PGI, were compared under two different consumer tests (laboratory and home). Under laboratorial conditions differences between breeds were found in flavour ($p<0.01$), tenderness and overall acceptability scores ($p<0.001$). Under home conditions, no differences were showed in flavour, but differences were kept in tenderness ($p<0.01$) and overall appraisal ($p<0.05$). In both tests, the most appreciated (overall) were MG, CH and MO. Punctuations of overall acceptability were globally higher at home than in laboratorial conditions. PCA was similar in both tests. Some goat breeds had similar acceptability scores than the meat from CH lambs, which had a PGI label.

Keywords: consumers, home test, laboratory test, meat acceptability

CONSERVACIÓN DE CARNE DE CORDERO ENRIQUECIDA EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y DIFERENTES ANTIOXIDANTES: EXTRACTO DE ACEITUNA RICO EN POLIFENOLES Y VITAMINA E

Apeleo, E.^{1*}, Muiño, I.², Pérez-Santaescolstica, C.¹, Bermejo, R.¹, De la Fuente, J.¹, Lauzurica, S.¹, Díaz, M.T.², López, O.² Cañeque, V.² y Pérez, C.³

¹Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, U.C.M. elicaz2007@gmail.com ²Dpto. Tecnología de los Alimentos, INIA. ³Dpto. Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, U.C.M. Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid. *elicaz2007@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las recomendaciones actuales de consumir menos grasas saturadas, han potenciado el estudio sobre la modificación de las dietas de los animales de abasto mediante la suplementación con diversos compuestos (Díaz *et al.*, 2011), que aumentan el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) beneficiosos, en particular, de la serie omega-3. Sin embargo este incremento en PUFA facilita el enranciamiento oxidativo de la carne (Giroux y Lacroix, 1998). Para prevenir o retardar la oxidación y preservar el color de la carne, se utilizan antioxidantes, especialmente de origen natural como la vitamina E (Lauzurica *et al.*, 2005) o extractos vegetales ricos en polifenoles (Nieto *et al.*, 2010). No obstante, hay pocos estudios que aclaren el papel de los antioxidantes naturales en la calidad de la carne de cordero enriquecida en ácidos grasos n-3.

En este trabajo se ha tratado de valorar la eficacia de los antioxidantes naturales suplementados en la dieta de cebo de corderos, a un pienso rico en ácidos grasos omega-3, para prolongar la vida útil de las carnes, utilizando extracto de aceituna rico en polifenoles (hidroxitirosol), vitamina E o el posible efecto sinérgico de los dos aplicados al mismo tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 corderos machos de raza Manchega (peso vivo inicial 14±1 kg) distribuidos aleatoriamente en 5 grupos experimentales. La dieta basal se formuló rica en ácidos grasos omega-3, con lino extrudido (al 6%) y aceite de pescado (al 1%). Un grupo fue suplementado con 300 ppm de vitamina E (acetato de α -tocoferol,) (GVE), dos grupos con extracto de aceituna rico en polifenoles (Hidroxitirosol 16 %) (Hytaolive®, Genosa I+D, Malaga, España) en dosis de 1500 ppm (G1500) y 3000 ppm (G3000), un cuarto grupo con 300 ppm de vitamina E y 1500 ppm de extracto de aceituna (GMIX) y un último grupo control (GC), solo con la dieta basal rica en ácidos grasos n-3. Los corderos fueron sacrificados con un peso medio de 26 kg. A las 24 horas del sacrificio el costillar fue troceado en chuletas de 2 cm de grosor, que se envasaron en atmósfera modificada (70:30, O₂:CO₂) distribuyéndolas al azar para los tres tiempos de conservación (0, 6 y 12 días). Se determinó el índice de oxidación lipídica mediante el test de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) expresado como mg de malonaldehído (MDA) por kg de carne (Botsoglou *et al.*, 1994), se midió el color por espectrofotometría, según el sistema CIE-L*a*b*, calculándose el porcentaje de metamioglobina por el procedimiento de Krzywicki (1979). Los datos fueron analizados estadísticamente usando el procedimiento MIXED del programa SAS 9.1. Para la comparación de medias se utilizó el test de Dunn-Šidák.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los TBARs (Figura 1(A)) fueron significativamente diferentes entre los días 0 y 6 para GC, G1500 y G3000 y entre 6 y 12 días para G1500. En los tratamientos GVE y GMIX no hubo diferencias significativas entre los días 0 y 6, ni entre 6 y 12, sólo entre los días 0 y 12 de conservación. Buckley *et al.*, (1995) señalaron que la vitamina E es el principal antioxidante liposoluble de los sistemas biológicos y que actúa como captador de radicales libres, siendo por lo tanto la vitamina E efectiva contra la oxidación lipídica. La proporción de metamioglobina (Figura 1(B)) aumenta con la conservación de manera similar para todos los grupos hasta el día 6. Desde el día 6 hasta el día 12 de conservación, en GC, G1500 y G3000 se observa un aumento significativo ($p < 0,05$), siendo superior para el grupo GC, mientras que los lotes suplementados con vitamina E, GVE y GMIX, la proporción permanece constante. El efecto preventivo de la suplementación con vitamina E en la dieta

frente a la decoloración de la carne también ha sido observado por Álvarez *et al.* (2008) y Ripoll *et al.* (2011) en corderos.

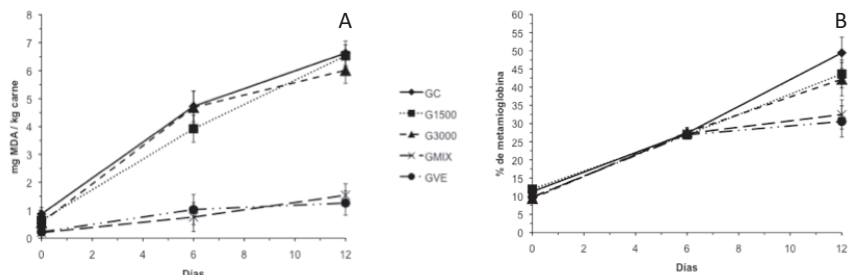


Figura 1. Evolución del TBARs (A) y de la proporción de metamioglobina (B) en carne de cordero en función del aporte de antioxidantes en la dieta, durante la conservación.

Tabla 1. Medias (error estándar) de los parámetros de color en función del tipo de tratamiento (TTO) y del periodo de conservación en días (C).

Medidas	C	Tratamientos (TTO)					Nivel de Significación		
		GC	G1500	G3000	GMIX	GVE	TTO	C	TTO x C
L*	0	39,21 (0,81)	41,09 (0,73)	39,64 (0,87)	37,20 (0,77)	39,35 (0,81)			
	6	43,00 (0,81)	44,30 (0,73)	43,00 (0,87)	41,61 (0,77)	42,77 (0,81)	***	***	NS
	12	45,13 (0,81)	46,83 (0,73)	44,09 (0,87)	41,82 (0,77)	42,52 (0,81)			
a*	0	6,47 ^x (0,55)	7,19 ^x (0,50)	7,31 ^x (0,59)	7,24 ^x (0,52)	6,81 (0,55)			
	6	10,30 ^y (0,55)	9,65 ^y (0,50)	10,16 ^y (0,59)	9,58 ^y (0,52)	9,35 (0,55)	*	***	***
	12	6,45 ^{a,x} (0,55)	6,28 ^{a,x} (0,50)	7,46 ^{ab,x} (0,59)	9,88 ^{b,y} (0,52)	9,40 ^b (0,55)			
b*	0	11,49 (0,55)	11,09 (0,49)	11,63 (0,58)	12,44 (0,51)	10,76 (0,55)			
	6	14,75 (0,55)	14,07 (0,49)	14,61 (0,58)	15,63 (0,51)	14,25 (0,55)	NS	***	NS
	12	15,84 (0,55)	14,56 (0,49)	14,66 (0,58)	15,77 (0,51)	13,22 (0,55)			
C*	0	13,27 (0,61)	13,30 (0,55)	13,78 (0,65)	14,41 (0,58)	12,80 (0,61)			
	6	18,08 (0,61)	17,11 (0,55)	17,82 (0,65)	18,38 (0,58)	17,09 (0,61)	NS	***	NS
	12	17,27 (0,61)	15,91 (0,55)	16,58 (0,65)	18,67 (0,58)	16,27 (0,61)			
h*	0	60,77 ^{xy} (1,94)	57,46 ^x (1,74)	57,70 (2,08)	59,72 (1,83)	57,81 (1,94)			
	6	55,25 ^x (1,28)	55,75 ^x (1,15)	55,02 (1,31)	58,67 (1,21)	56,88 (1,28)	*	***	***
	12	68,28 ^{a,y} (2,01)	66,89 ^{ab,y} (1,80)	62,96 ^{abc} (2,15)	57,99 ^{bc} (1,90)	54,45 ^c (2,01)			

* p<0,05; *** p<0,001; NS no significativo.

a,b,c Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

x,y Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05)

El tratamiento mostró un efecto significativo sobre L* (Tabla 1), siendo los valores más altos en los grupos GC, G1500 y G3000 y significativamente diferentes a GMIX y GVE. Los parámetros L*, b* y C* estuvieron afectados por la conservación, aumentando éstos con el tiempo de almacenamiento. El valor a* (índice de rojo) se mantiene constante del día 6 al 12 para GVE y GMIX, mientras que en los otros 3 grupos hubo una reducción de este parámetro, de manera que al final de la conservación, la carne de los grupos GC y G1500 fue menos roja. En cuanto al índice colorimétrico h* hemos observado un aumento del día 6 al día 12 para GC y G1500 ($p < 0,001$), no ocurriendo así en los grupos con vitamina E y G3000. Por el contrario, para Ripoll *et al.* (2011) el valor h* aumentó con el periodo de conservación, suplementando la dieta de corderos con vitamina E y conservando la carne en MAP durante 13 días.

La suplementación en la dieta de corderos con vitamina E sola o con extracto de aceituna rico en polifenoles produjo mejora en conservación de la carne enriquecida en ácidos grasos omega 3, no encontrándose efecto sinérgico entre los dos antioxidantes. El extracto de aceituna rico en polifenoles suplementado no mostró ningún efecto sobre la conservación de la carne, aunque podemos afirmar que la suplementación con 3000 ppm del extracto mantuvo el color de la carne durante la conservación al mismo nivel que los suplementados con vitamina E.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez, I., De la Fuente, J., Díaz, M.T., Lauzurica, S., Pérez, C. & Cañeque, V. 2008. *Animal* 9: 1405-1411. • Botsoglou, N.A., Ftouris, D.J. & Papageorgiu, G.E. 1994. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1931-1937. • Buckley, D.J., Morrissey, P.A., & Gray, J.L. 1995. *J. Anim Sci*, 73: 3122-3130. • Díaz, M.T., Cañeque, V., Sánchez, C.I., Lauzurica, S., Pérez, C., Fernández, C., Álvarez, I. & De la Fuente, J. 2011. *Food Chem.*, 124: 147-155. • Giroux, M. & Lacroix, M. 1998. *Food Res. Internat.* 31, 257–264. • Krywicki, K. 1979. *Meat Sci.*, 3: 1-10. • Lauzurica, S., De la Fuente, J., Díaz, M.T., Álvarez, I., Pérez, C. & Cañeque, V. 2005. *Meat Sci.* 70: 639-646. • Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., Garrido, M.D. 2010. *Meat Sci.*, 85: 82-88. • Ripoll, G., Joy, M., Muñoz, F. 2011. *Meat Sci.*, 87, 88-93.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RTA2009-00087-C02-01 (INIA) y P2009/AGR-1704 (Comunidad de Madrid). Los autores agradecen la asignación de una beca FPI-INIA a la doctoranda Iria Muíño y al CONICITY-Chile por la concesión de la beca predoctoral a Elizabeth Apeleo.

STORAGE OF OMEGA-3 FATTY ACID ENRICHED LAMB MEAT BY SUPPLEMENTED AND ALSO WITH DIFFERENT ANTIOXIDANTS: OLIVE EXTRACT RICH IN HYDROXYTIROSOL AND VITAMIN E

ABSTRACT: Forty male lambs Manchego breed were used. The basal diet was formulated to be rich in omega-3 fatty acids, with extruded linseed (6%) and fish oil (1%). The lambs were randomly distributed in five experimental groups: 300 ppm of vitamin E (α -tocopherol acetate) (GVE), two groups with olive extract rich in hydroxytyrosol dose of 1500 ppm (G1500) and 3000 ppm (G3000), a group with 300 ppm of vitamin E and 1500 ppm of olive extract (GMIX) and a control group (CG). The TBARs values increased from 0 to 12 days in GC, G1500 and G3000. The metmyoglobin proportion increased during storage, being equal for all groups the first 6 days. In G1500, G3000 and GC, a significant increment in metmyoglobin proportion between 6 to 12 days of storage WAS been observed. The value of a* increased from day 0 to 6 of storage in GC, G1500, G3000 and GMIX whereas decrease at 12 day of storage except in GMIX which was similar to 6 day value. GVE the value of a* was constant along storage. The value of h* increased from 6 to 12 day for GC and G1500 and it was relatively constant along storage in G3000, GMIX and GVE.

Keywords: hydroxytyrosol, vitamin E, colour, lamb meat

EMPLEO DE SEMILLA EXTRUSIONADA DE LINO EN LA RACIÓN DE OVEJAS CHURRAS: EFECTO SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA Y EL COLOR DE LA CARNE DE LEHAZO

Gallardo, B¹., Vieira, C²., Rubio, B². y Manso, T.^{1*}

¹ ETS Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. 34004 Palencia. tmanso@agro.uva.es

² Estación Tecnológica de la Carne Instituto Tecnológico Agrario Castilla y León. Guijuelo Salamanca

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han desarrollado estrategias de alimentación de rumiantes orientadas a enriquecer el contenido de la leche y de la carne en ácidos grasos poliinsaturados asociados con efectos beneficiosos para la salud humana (Kaur *et al.*, 2011). La inclusión de semilla extrudida de lino, rica en ácido linoléico (C18:3 n-3), en las dietas de rumiantes incrementa los niveles de CLA y ácidos grasos poliinsaturados n-3 en la carne y en la leche (Gómez-Cortés *et al.*, 2009; Berthelot *et al.*, 2012). Sin embargo, estos cambios en el perfil lipídico de la carne pueden alterar sus características físicas y químicas e influir en su vida útil. El color es uno de los parámetros más valorados por los consumidores en el momento de la compra de la carne (Ruiz *et al.*, 2005) y está ligado a la oxidación de los lípidos y de los pigmentos de la carne (Buckley *et al.*, 1995). El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la incorporación de semilla extrudida de lino en la ración de ovejas Churras al inicio de lactación sobre la estabilidad oxidativa y el color de la carne envasada en atmósfera modificada de los lechazos producidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Veinticuatro ovejas de raza Churra, con un peso vivo de $58,6 \pm 1,69$ kg, fueron seleccionadas y alimentadas hasta el momento del parto con la misma ración. A los dos días después del parto, las ovejas se asignaron, de forma equilibrada según la producción de leche en la lactación anterior, la edad y el peso, a dos tratamientos experimentales de acuerdo con la ración que recibieron: *control* (ración con jabón cálcico de aceite de palma, MAGNAPAC[®]) y *linaza* (ración con TRADILIN[®], producto que consiste en un 30% de trigo y un 70% de semilla extrusionada de lino). Cada oveja recibió 2,1 kg de materia seca (MS) al día de una ración total mezclada (TMR) más un 10% de paja de cereales. La fórmula y composición química de las raciones experimentales figuran en la Tabla 1. Los corderos permanecieron con sus madres desde el nacimiento hasta que alcanzaron el peso de sacrificio, que estuvo prefijado en 11 kg. Tras 24 horas de oreo a 4°C, se extrajo el músculo *Longissimus thoracis et lumborum* de la media canal derecha, que fue dividido en porciones que, de forma aleatoria, se dispusieron en bandejas, a razón de tres trozos por bandeja. Las bandejas obtenidas se envasaron con gases, mediante una termoselladora TECNOVAC mod: Linvac 400. La mezcla de gases utilizada fue 70:20:10 de O₂: CO₂: N₂. Las muestras se colocaron en un mural refrigerado cuya temperatura se programó a 2°C en condiciones estándar de iluminación hasta el momento de la toma de muestra. Los tiempos de muestreo seleccionados fueron 0, 5, 8 y 13 días de envasado. Cada día de muestreo se emplearon 6 bandejas, 2 por cada tratamiento, para realizar los correspondientes análisis. La evolución del color y de la oxidación lipídica (TBARS) de la carne se midió a los 0, 5, 8 y 13 días de almacenamiento. Para la medida instrumental del color se utilizó un espectrofotómetro de reflectancia (CM-2600d, Konica-Minolta, Sensing, Inc., Alemania) con el que se registraron los parámetros L*, a* y b* del espacio CIELAB, calculándose las magnitudes H* y C*. El porcentaje de metamioglobina se obtuvo mediante fórmula indicada por Krzywicki, (1979). Para la determinación del nivel de oxidación lipídica (TBARS) se siguió el método descrito por Maraschiello *et al.* (1999). Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de medidas repetidas (PROC MIXED) perteneciente al paquete estadístico SAS 9.2. (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evolución del color, del contenido en metamioglobina y de la oxidación lipídica de la carne envasada en atmósfera modificada durante los 13 días de almacenamiento, se puede observar en la Figura 1. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en ninguno de los parámetros colorimétricos (L*, a*, b*, H* y C*) de la carne debidas al tipo de

tratamiento (Tabla 2). Estos resultados están de acuerdo con los observados por Moloney *et al.* (2012) en corderos ligeros al incluir aceite de linaza en su ración. El valor de la luminosidad (L*) de la carne de ambos tratamientos aumento al aumentar el tiempo de exposición. El valor H* se mantuvo bastante estable a lo largo del tiempo de exposición, siguiendo evoluciones similares a partir del día 5 de exposición en la carne de los dos tratamientos experimentales. Como se puede observar en la Figura 1, el contenido de metamioglobina (%) y el nivel de oxidación lipídica (μg MDA/mg de carne) aumentaron con el tiempo de almacenamiento, no observándose diferencias significativas ($P > 0,05$) debidas al tratamiento para ninguno de los tiempos estudiados. Las reacciones de oxidación lipídica favorecen la formación de metamioglobina en la superficie del músculo contribuyendo al proceso de decoloración del mismo (Kannan, 2001) de tal manera que, al aumentar el nivel de oxidación lipídica con el tiempo, aumenta también el contenido en metamioglobina de la carne. Además, la oxidación de la carne esta asociada a reducciones en el contenido de agua retenida entre las miofibrillas del músculo, con lo que se aumentan las pérdidas de agua de la carne y por consiguiente el valor de L* de la carne (Elisabeth y Steven, 2005). La inclusión de semilla extrusionada de lino no influyó significativamente ($P > 0,05$) en los valores de oxidación lipídica (TBARS) de la carne. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Alberti *et al.* (2009) en terneros alimentados con semilla de linaza. A los 8 días de exposición la carne de ambos tratamientos (control y linaza) presentó valores superiores al umbral de rancidez de la carne fijado $2 \mu\text{g}$ MDA/mg de carne. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que la incorporación de semilla extrusionada de lino en la ración de ovejas en inicio de lactación podría permitir aumentar el nivel de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en la grasa intramuscular de los corderos lechales producidos sin alterar la estabilidad oxidativa de los lípidos y de los pigmentos de la carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti, P., Olleta, J. L., Roncalés, P., Ripoll, G., Muela, E., Panea, B., Camo, J. & Joy, M. 2009. XIII Jornadas sobre producción animal AIDA. Tomo II: 556-558.
- Berthelot, V., Bas, P., Pottier, E. & Normand, J. 2012. Meat Sci. 90:548-557.
- Buckley, D. J., Morrissey, P. A. & Gray, J. I. 1995. J. Anim. Sci. 73:3122-3130.
- Elisabeth, H. C. & Steven, M. L. 2005. Meat Sci. 71:194-204.
- Gómez-Cortés, P., Bach, A., Luna, P., Juarez, M. & de la Fuente, M. A. 2009. J. Dairy Sci. 92:4122-4134.
- Kannan, G., 2001. Small Ruminant Res. 42:67-75.
- Kaur, G., Cameron-Smith, D., Garg, M. & Sinclair, A. J. 2011. Progr. Lipid Res. 50:28-34.
- Krzywicki, K. 1979. Meat Sci. 3:1-10.
- Maraschiello, C., Sarraga, C. & Garcia Reguero, J.A. 1999. J. Agric. Food Chem. 47: 867-872.
- Moloney, A. P., Kennedy, C., Noci, F., Monahan, F. J. & Kerry, J. P. 2012. Meat Sci. 92:1-7.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (proyectos VA058A07 y GR158). Los autores agradecen a INATEGA (León) su colaboración. B. Gallardo disfruta de un contrato PIRTU de la Junta de Castilla y León.

SUPPLEMENTATION OF EXTRUDED LINSEED IN LACTATING CHURRA EWE RATIONS: EFFECTS ON OXIDATIVE STABILITY AND COLOR OF SUCKLING LAMB MEAT

ABSTRACT: Twenty four Churra ewes and their sucking lambs were used to study the effects of dietary supplementation of ewes with extruded linseed on meat colour and oxidative stability of their suckling lambs. The lambs were fed exclusively by suckling from their respective mothers and slaughtered when they reached 11 kg body weight. Evolution of colour, metamyoglobin content and lipid oxidation (TBARS) was measured in muscle *Longissimus dorsi* during storage at refrigerated display conditions. No statistical differences were found between treatments ($P > 0,05$).

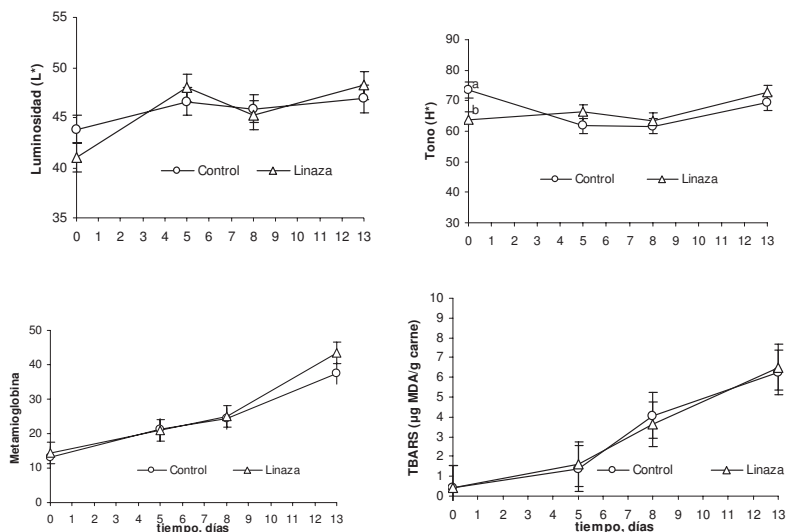
Keywords: suckling lamb, linseed, colour, tbars

Tabla 1. Fórmula y composición química de las raciones experimentales

Ingredientes (%)	Tratamientos experimentales	
	Control	Linaza
Alfalfa deshidratada	39,38	36,95
Harina de Soja	13,77	12,92
Maíz Grano	11,83	11,10
Avena	10,38	9,74
Cebada	7,86	7,37
Pulpa remolacha	7,86	7,37
Melaza	4,95	4,64
Concentrado vitamínico-mineral	0,97	0,91
Magnapac®	3,00	
Tradi-lin®		9,00
Composición química (%MS)		
MS	88,87	88,81
FND	28,34	26,59
FAD	17,56	16,48
PB	16,86	17,69
EE	5,30	5,16

Tabla 2. Significación (*p*-valor) del efecto tratamiento, tiempo de maduración y su interacción sobre el color, contenido de metamioglobina (%) y oxidación lipídica (TBARS, μg MDA/ g carne) de la carne.

	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento x Tiempo
L*	0,852	0,003	0,414
a*	0,604	<0,001	0,057
b*	0,140	<0,001	0,368
H*	0,985	0,005	0,024
C*	0,248	<0,001	0,160
Metamioglobina (%)	0,422	<0,001	0,766
Tbars (μg MDA/ g carne)	0,992	0,004	0,988

**Figura 1.** Evolución de la luminosidad, tono, metamioglobina y TBARS de la carne de corderos lechales envasada en atmósfera modificada según el tipo de ración de sus respectivas madres (letras diferentes para el mismo tiempo indican diferencias significativas entre tratamientos, $P < 0,05$)

EMPLEO DE ORUJO DE UVA EN LA RACIÓN DE CORDEROS DURANTE EL PERIODO DE CRECIMIENTO-CEBO: INGESTIÓN, RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS Y CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL.

Guerra-Rivas, C.¹, Gallardo, B.¹, Lavín, P.², Mantecón A.R.², Vieira, C.³ y Manso, T.^{1*}

¹Área de Producción Animal. Dpto. Ciencias Agroforestales. ETS Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. 34004 Palencia.

²Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). 24346 Grulleros (León)

³Estación Tecnológica de la Carne (ITACYL). 37770 Guijuelo (Salamanca).

*e-mail: tmanso@agro.uva.es

INTRODUCCIÓN

La utilización de subproductos de la elaboración del vino en la alimentación de rumiantes en general, y del ganado ovino en particular, presenta un gran interés ya que permite el aprovechamiento de subproductos (reduciendo el problema medioambiental y económico que presentan en relación con su almacenaje, transformación y eliminación), y la inclusión en las raciones de una interesante cantidad de compuestos fenólicos a los que se han atribuido importantes efectos beneficiosos entre los que destaca su poder antioxidante (Gladine et al., 2007; Moñino et al., 2008). Se estima que sólo un 3% de los residuos de vinificación se destinan a alimentación animal debido a su bajo valor nutritivo. Sin embargo, su uso en raciones de corderos durante el periodo de crecimiento-cebo podría presentar grandes ventajas, desde un punto de vista tecnológico y funcional, sobre la calidad de la carne producida. El objetivo de este trabajo ha sido comparar el efecto de la inclusión de orujo de uva tinta y de otros antioxidantes habitualmente utilizados en alimentación animal sobre la ingestión, rendimientos productivos y características de la canal de corderos durante el periodo de crecimiento-cebo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Ganadería de Montaña (León). Para ello, se utilizaron un total de 48 corderos de raza Merina, con un peso vivo medio inicial de 14,3 ± 2,05 kg. Los animales se alojaron individualmente y se asignaron, de forma equilibrada según su peso, a cuatro tratamientos experimentales de acuerdo con el pienso concentrado que recibieron: *control* (concentrado a base de cebada (74%) y soja integral (20%) y 50 UI de vitamina E por kg), *vitamina E* (concentrado control con 500 UI de vitamina E por kg), *EGU* (concentrado control con 50 mg por kg de extracto de granilla de uva) y *orujo* (concentrado control con 50 g de MS de orujo de vino tinto por kg). En la Tabla 1 se presenta la composición química de los piensos experimentales. El contenido en MS, MO, PB y EE de los piensos se determinó de acuerdo con la AOAC (2003) y el contenido en FND y FAD se determinó según el procedimiento de Van Soest et al. (1991).

Tabla 1. Composición química de los piensos utilizados durante el cebo de los corderos (g kg⁻¹ MS).

	Control	Vitamina E	EGU ^a	Orujo
Cenizas	68,2	73,8	80,9	69,3
PB	189,1	188,8	187,2	187,2
FND	153,5	156,7	153,2	172,1
FAD	56,6	61,1	61,8	81,1
Extracto etéreo	43,9	43,8	44,6	46,6

^a EGU: extracto de granilla de uva

Tanto el pienso como la paja de cebada se suministraron *ad libitum* a cada cordero. Diariamente se controló la ingestión de forraje y concentrado por separado. La oferta y los restos no consumidos de pienso y de forraje se recogieron cada mañana, se pesaron y semanalmente se determinó su contenido en MS. Los corderos se pesaron dos veces por semana, a primera hora de la mañana y antes de la administración del alimento y, cuando alcanzaron el peso establecido (aproximadamente 27 kg), fueron sacrificados. La ganancia diaria de peso (GMD) se estimó por regresión lineal del peso frente a la edad de los animales. El índice de conversión se calculó como el cociente entre la ingestión media diaria de materia seca de pienso y la ganancia media diaria de peso. La canal obtenida (canal

caliente) fue refrigerada durante 24h a 4°C. Sobre la canal fría, se midió el pH, se separó y se pesó la grasa pelvico renal, se midió el espesor de la grasa dorsal, se determinó de forma subjetiva la conformación y engrasamiento de la canal (escala 1-15) y se midió el color del músculo *Rectus abdominis* y de la grasa subcutánea empleando un colorímetro portátil Minolta CM-2002 (Konica-Minolta Sensing, Japón), siguiendo las coordenadas CIE L*a*b* (CIE, 1986). Todos los datos se analizaron utilizando el modelo lineal general (PROC GLM), del paquete estadístico SAS 9.2. (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestran los valores medios de peso, ingestión, ganancia media diaria e índice de conversión de los corderos pertenecientes a los distintos tratamientos experimentales. Tal y como puede observarse en la Tabla 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en los parámetros relacionados con la ingestión total de materia seca de pienso y paja entre los cuatro tratamientos experimentales. Aunque el orujo incrementa el contenido fibroso de la ración y, por tanto, produce una dilución energética en la dieta, el nivel de incorporación empleado en este trabajo (5 %), no dio lugar a diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en el crecimiento e índices de conversión del alimento.

Tabla 2. Valores medios de peso, ingestión, ganancia media diaria e índices de conversión de la MS para cada tratamiento experimental.

	Control	Vitamina E	EGU	Orujo	RSD	sig
Peso vivo inicial (kg)	13,6	14,5	14,3	14,9	2,03	ns
Peso vivo sacrificio (kg)	27,0	27,1	27,2	27,1	0,65	ns
Ingestión (g MS animal ⁻¹ día ⁻¹)						
Pienso	779	751	782	792	78,6	ns
Paja	31	29	34	30	9,9	ns
Total	810	779	817	821	76,3	ns
GMD (g animal ⁻¹ día ⁻¹)	267	268	290	279	47,6	ns
Índice de conversión del pienso	2,90	2,84	2,71	2,88	0,375	ns
Días hasta sacrificio	50	48	46	44	10,7	ns

Nivel de significación: ns, $P > 0,05$.

Tal y como se presenta en Tabla 3, no se apreciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el peso de la canal caliente, peso de la canal fría, pH, rendimiento a la canal, conformación y color del músculo *Rectus abdominis* debidas al tipo de pienso suministrado. Tampoco se vieron afectados de forma significativa ($P > 0,05$) los parámetros relacionados con el engrasamiento (estado de engrasamiento, peso de la grasa pelvico renal, espesor de la grasa dorsal y color de la grasa subcutánea) debido a los diferentes tratamientos experimentales. Únicamente el valor de b* de la grasa subcutánea tendió ($P < 0,1$) a ser menor en los corderos alimentados con orujo, sin que los otros parámetros de color de la grasa se vieran afectados. Estos resultados contrastan con los obtenidos por algunos autores que han señalado que algunos parámetros de calidad de la canal, de la carne y de la grasa de corderos pueden afectarse por la presencia de antioxidantes y de alimentos altamente lignificados y con alto contenido en taninos, como es el caso del orujo de uva (Vasta et al., 2008). Como conclusión de este trabajo podemos indicar que la inclusión de distintos antioxidantes (vitamina E y extracto de semilla de uva), así como de un 5% de orujo de uva tinta en el pienso de corderos durante el periodo de crecimiento-cebo podría permitir modificar las características funcionales y tecnológicas de la carne de cordero sin que la ingestión, los rendimientos productivos y las características de las canales se vieran afectados.

Tabla 3. Parámetros que definen la calidad de la canal para cada tratamiento experimental.

	Control	Vitamina E	EGU	Orujo	RSD	sig
Peso canal caliente (kg)	12,8	12,9	13,1	12,7	0,55	ns
Peso canal fría (kg)	12,4	12,7	12,6	12,4	0,49	ns
Rendimiento comercial (%)	46,0	46,7	46,5	45,7	1,69	ns
pH canal ^{24h}	5,61	5,61	5,69	5,65	0,105	ns
Pérdidas por oreo (%)	2,6	2,4	3,5	2,5	1,91	ns
Conformación (escala 1-15)	8	8	8	8	0,5	ns
Color <i>Rectus abdominis</i>						
L*	50,8	51,5	50,3	54,1	4,34	ns
a*	9,38	9,17	9,08	8,83	1,76	ns
b*	3,02	2,83	2,25	3,64	2,280	ns
Tono (H*) ^a	59,5	73,9	62,6	66,6	32,72	ns
Saturación o Cromo (C*) ^b	10,1	9,72	9,54	10,2	1,610	ns
Engrasamiento (escala (1-15))	5	5	5	5	1,1	ns
Grasa pélvicorenal (g)	205	253	265	230	74,5	ns
Espesor grasa dorsal (mm)	2,5	3,1	3,0	2,5	1,07	ns
Color grasa subcutánea						
L*	69,2	67,5	68,3	67,5	3,57	ns
a*	4,22	4,47	4,53	4,85	1,386	ns
b*	10,0 ^a	9,31 ^a	9,57 ^a	7,99 ^b	1,791	†
Tono (H*) ^a	23,0	25,8	25,2	32,1	10,87	ns
Saturación o Cromo (C*) ^b	10,9	10,4	10,6	10,0	1,31	ns

^a Tono (H*) = $57,29 \times \text{Arctang} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$; ^b Cromo (C*) = $\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$.

Nivel de significación: No significativo (ns) = p>0,10; †=p<0,10.

Valores en la misma fila seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0,10).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. 2003. 17th ed. Gaithersburg, MD, USA
- CIE Colorimetry. 1986. Vienna.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Gruffat, D., Bauchart, D. & Durand, D. 2007. Anim. Feed Sci. Tech. 139, 257-272.
- Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J.A., Lafuente, A. & Jordán, M.J. 2008. J. Agric. Food Chem. 56, 3363-3367.
- Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M. & Priolo, A. 2008. Anim. Feed Sci. Tech. 147, 223-246.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.

Agradecimientos: Financiación procedente de INIA (RTA2010-0068-C02-02) y de la Consejería de Educación de la JCyL (VA196A11-2). C. Guerra-Rivas disfruta de una beca FPU del Ministerio de Educación y B. Gallardo de un contrato PIRTU de la JCyL.

EFFECT OF GRAPE POMACE SUPPLEMENTATION ON INTAKE, ANIMAL PERFORMANCE AND CARCASS CHARACTERISTICS OF FATTENING LAMBS.

ABSTRACT: Forty-eight Merino lambs were used to study the effect of feeding grape pomace and others commonly used antioxidants on intake, animal performance and carcass characteristics. Lambs were assigned to four treatments: *control* (50 IU of vitamin E per kg), *vitamin E* (500 IU of vitamin E per kg), *EGU* (including 50 mg of grape seeds extract per kg) and *grape pomace* (5% of grape pomace of red wine per kg). Lambs were slaughtered at 27 kg live weight. There were no significant differences between experimental treatments on intake, average daily gain, carcass yield and carcass characteristics of lambs.

Keywords: lamb, grape pomace, carcass.

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE VINO TINTO EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE HAMBURGUESAS DE CORDERO

Muño, I.¹, Apeleo, E.², Pérez-Santaescolástica, C.², Díaz, M.T.¹, Pérez, C.³, Rivas-Cañedo, A.¹, Bermejo, R.², López, O.¹, Lauzurica, S.², De la Fuente, J.² y Cañeque, V.¹
¹INIA, Dpto. Tec. Alimentos, Ctra. De la Coruña, km 7.5, 28040. Madrid. muino.iria@inia.es.
²UCM, Fac. Vet. Dpto. Prod. Animal, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid. ³UCM, Fac. Vet. Dpto. Fisiología (Fisiología Animal)Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda actual de productos alimentarios más saludables, principalmente referente a un contenido en grasas más adecuado a las recomendaciones nutricionales, ha aumentado el interés por la formulación de productos ricos en ácidos grasos omega-3 (ω 3) por su repercusión positiva en la salud del consumidor. Sin embargo, la elaboración de producto con una mejor relación PUFA/SFA da lugar al aumento de los procesos oxidativos durante su conservación, lo que provoca una pérdida del valor nutritivo y de la calidad organoléptica del mismo. Para disminuir la aparición de fenómenos oxidativos, la industria cárnica ha empleado de forma tradicional diversos antioxidantes sintéticos como método eficaz y económico. Sin embargo, el empleo de antioxidantes sintéticos está limitado, debido a su volatilidad e inestabilidad a altas temperaturas, a las restricciones desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y debido también, a la creciente demanda por parte del consumidor de "productos naturales" (Armenteros *et al.*, 2012). Por este motivo, existe un gran interés por parte de la industria cárnica en la búsqueda de compuestos que cumplan estos requisitos. En este sentido, los compuestos polifenólicos procedentes de vegetales están teniendo un gran auge al presentar elevada capacidad antioxidante y al ser de origen natural. En el vino tinto se presentan numerosos compuestos polifenólicos (principalmente proantocianidinas y sus monómeros) derivados tanto de la uva como del procesado, que presentan una gran actividad antioxidante.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la adición de extracto de vino sobre la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cordero enriquecidas en ω 3 y conservadas en MAP (70% O₂/30% CO₂) durante 9 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de carne se obtuvieron de piernas de cordero tipo ternasco. Después de limpiar la carne de grasa subcutánea y tejido conjuntivo, se troceó en dados y se pasó dos veces por una picadora con un paso de 5 mm. Se realizaron 4 lotes, todos ellos enriquecidos en ácidos grasos ω 3 mediante la adición en emulsión acuosa de un producto comercial rico en ácidos grasos ω 3 para obtener 100 mg de ácidos grasos de cadena larga/100 g de carne. A tres lotes se les añadió extracto de vino tinto (EV) (Provinols®, Seppic S. A. France), como solución acuosa, a 3 dosis diferentes para obtener una concentración final de 50 (EV1), 100 (EV2) y 200 (EV3) mg GAE/kg de carne. Según la especificación del fabricante, la composición de polifenoles del extracto de vino era proantocianidinas y sus monómeros, catequinas y epicatequinas en una riqueza del 38 % de polifenoles. El último lote, con el mismo volumen de agua destilada que el resto de lotes pero sin antioxidantes, se mantuvo como control (C). Se realizaron hamburguesas de 100 g de carne (3 hamburguesas por lote) que se conservaron en atmósfera modificada (MAP, 70% O₂/30% CO₂) durante 0, 3, 6 y 9 días en refrigeración (4°C). En cada periodo de conservación, los análisis realizados fueron: determinación de la tasa de decoloración de la carne como A₅₈₀-A₆₃₀ (Van den Oord y Wesdorp, 1971) usando un espectrofotómetro CM-2600d (Minolta), determinación de la oxidación lipídica medida como TBARS (Maraschiello *et al.*, 1999), determinación de la oxidación de proteínas mediante la cuantificación de grupos carbonilos (Oliver *et al.*, 1987) y cuantificación de los ácidos grasos de cadena larga (CL) (Lee *et al.*, 2012). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA bifactorial para estudiar el efecto del lote (L), el efecto del periodo de conservación (PC) y la interacción entre ambos factores (PC*L). Cuando la interacción resultó significativa, las medias se compararon mediante el test de Tukey/Kramer con un nivel de significación p<0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la tasa de decoloración, oxidación lipídica, oxidación de proteínas y cantidad de ácidos grasos de cadena larga, se presentan en la *Tabla 1*.

Se observó una interacción entre el lote y el periodo de conservación ($p=0,01$) para la tasa de decoloración de la carne. Los lotes EV2 y EV3 presentaron la menor tasa de decoloración en la hamburguesa a partir del día 6 de conservación en comparación con el lote C, presentando la hamburguesa del lote EV1 una decoloración intermedia. Del mismo modo, Jongberg *et al.* (2011) observaron que la utilización de extracto de uva blanca (principalmente compuesto por proantocinidinas) a un nivel de 500 ppm, preservó el color de hamburguesas de vacuno conservadas en MAP (70% O₂/30% CO₂) durante 9 días.

Los valores de TBARS estuvieron afectados por el lote y por el periodo de conservación, existiendo una interacción entre ambos factores ($p<0,001$). La oxidación lipídica en el lote C aumentó significativamente a partir del día 3 de conservación, en comparación con los lotes con extracto de vino. A día 3, los lotes EV presentan el mismo grado de oxidación lipídica, pero a día 6, el lote EV3 presentó valores de TBARS significativamente menores que los lotes EV1 y EV2. Sin embargo, a día 9, los 3 lotes de EV presentaron el mismo valor de TBARS, siendo menor que en el lote C. En la misma línea, la adición de harina de semilla de uva a salchichas de porcino (Özvural y Vural, 2011) y de extracto de semilla de uva a hamburguesas de porcino (Carpentier, 2007), dio lugar a valores de TBARS menores que en los productos no suplementados.

La oxidación proteica estuvo afectada por el periodo de conservación ($p<0,001$), aumentando los grupos carbonilos en todos los lotes a lo largo de la conservación. Sin embargo, comparando el aumento en grupos carbonilos entre el día 0 y el día 9 de conservación (dato no mostrado) para los diferentes lotes, se observó que la adición de EV dio lugar a un menor aumento en grupos carbonilos ($p<0,036$) que en el lote C. El mismo resultado se encontró al adicionar hamburguesas de vacuno con extracto de uva blanca durante 9 días en MAP (Jongberg *et al.*, 2011).

El periodo de conservación afectó ($p<0,001$) al contenido en ácidos grasos de cadena larga de la carne, disminuyendo su cantidad en todos los lotes a partir del día 3 de conservación. Teniendo en cuenta la disminución en el contenido en CL durante la conservación (día 0 menos día 9) (dato no mostrado), se pudo observar un efecto del lote ($p=0,002$). Los lotes EV2 y EV3 presentaron una menor disminución en CL durante la conservación en comparación con el lote C, y el lote EV1 presentó un valor intermedio entre el lote C y EV2.

Concluyendo, la adición de extracto de vino a hamburguesas de cordero mejoró la estabilidad oxidativa de las mismas durante su conservación, siendo necesaria la dosis más elevada para obtener el mejor resultado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armenteros, M., Ventanas, S., Moncuerde, D., Estévez, M. y Ventanas, J. 2012. Eurocarne. 207: 63-73 • Carpenter, R., O'Grady, M.N., Callghan, Y.C., O'Brien, N.M. y Kerry, J.P. 2007. Meat Sci. 76: 604-610 • Jongberg, S., Skov, S.H., Tørngren, Skibsted, L.H. y Lund, M. 2011. Food Chem. 128: 276-283 • Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Kim, E.J. y Scollan, N.D. 2012. Meat Sci. 92: 863-866 • Maraschiello, C., Sarraga, C. y García Regueiro, J.A. 1999. J. Agr. Food Chem. 47: 867-872 • Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S. y Stadtman, E.R. 1987. J. Biol. Chem. 262: 5488-5491 • Özvural, E.B. y Vural, H. 2011. Meat Sci. 88: 179-183 • Van den Oord, A. y Wesdorp, J.J. 1971. J. Food Technol. 6: 1-13

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RTA2009-00087-C02-01 (INIA) y P2009/AGR-1704 (Comunidad de Madrid). Los autores agradecen la asignación de una beca FPI-INIA a la doctoranda Iria Muñío y al CONICITY-Chile por la concesión de la beca predoctoral a Elizabeth Apeleo.

Tabla 1. Tasa de decoloración (A_{580} - A_{630}) en %, valores de TBARS (mg MDA/kg carne), valores de oxidación proteica (nmol carbonilos/mg proteína) y contenido en ácidos grasos de cadena larga (CL) (mg/100g de carne) de hamburguesas de cordero enriquecidas en W3 según los diferentes lotes: control (C) y extracto de vino (EV), durante el periodo de conservación (PC) en MAP (70% O_2 /30% CO_2).

	PC Días	Lote (L)				EEM ¹	Significación		
		C	EV1	EV2	EV3		PC	L	PC*L
A_{580} - A_{630}	0	a52,	a47,8	a49,8	a42,9	2,80	***	ns	**
	3	b41,0	b38,2	b34,7	b36,5				
	6	c3,97 ^x	c4,98 ^{xy}	c5,71 ^{yz}	c7,33 ^z				
	9	c5,73 ^x	c6,97 ^{xz}	c9,15 ^y	c7,58 ^{zy}				
TBARS	0	a0,41	a0,47	a0,24	a0,35	0,42	***	***	***
	3	b3,04 ^x	a0,83 ^y	a0,45 ^y	a0,58 ^y				
	6	c5,57 ^x	b3,74 ^y	b3,56 ^y	b1,81 ^z				
	9	c6,66 ^x	c4,99 ^y	c4,69 ^y	c3,59 ^y				
Carbonilos	0	1,75	2,50	2,65	2,32	0,66	***	ns	Ns
	3	2,85	3,22	3,14	2,63				
	6	3,98	3,52	3,57	2,69				
	9	5,11	4,78	3,64	3,95				
CL	0	124,7	125,7	121,0	106,7	27,0	***	ns	ns
	3	117,5	120,0	126,9	87,6				
	6	93,5	94,8	78,2	74,0				
	9	24,8	46,1	59,2	60,4				

¹ Error estándar de la media

*** p<0,001; ** p<0,01; ns: no significativo

^{x,y,z} Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05)

EFFECT OF RED WINE EXTRACT ON OXIDATIVE STABILITY OF LAMB PATTIES ENRICHED WITH OMEGA-3 FATTY ACIDS

ABSTRACT: Red wine is a great source of polyphenols compounds which exert a high antioxidant capacity. The effect of red wine extract (EV) on the oxidative stability of lamb patties in terms of discolouration rate, lipid oxidation, protein oxidation, and long-chain fatty acids content was investigated. Ground lamb meat enriched in W3 fatty acids were divided into four treatments. Three treatments were supplemented with 3 doses of EV being 50 (EV1), 100 (EV2) and 200 (EV3) mg GAE/kg meat and, the last one, without antioxidant supplementation, was kept as control (C). The lamb patties were stored under MAP (70% O_2 /30% CO_2) during 9 days (PC). There was an interaction between treatment (L) and storage period (PC) (p<0.001) for discolouration rate and lipid oxidation. Groups EV2 and EV3 kept meat colour stability over 9 days of storage in comparison with the treatment C, with the group EV1 showing an intermediate value. In EV, the TBARS values were less than in the treatment C, without any differences between doses. The protein oxidation and the long chain fatty acid (LC) content were affected by storage period (p<0.001), increasing the carbonyl groups and decreasing the LC content in all treatments.

Keywords: colour, lipid oxidation, protein oxidation, polyphenols

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN EN LA DIETA CON EXTRACTO DE VINO TINTO O CON VITAMINA E EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SENSORIAL DE CARNE DE CORDERO ENRIQUECIDA EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3

Muño, I.¹, Apeleo, E.², Pérez-Santaescolástica, C.², López, O.¹, Rivas-Cañedo, A.¹

Lauzurica, S.², De la Fuente, J.², Pérez, C.³, Cañeque, V.¹ y Díaz, M.T.¹

¹INIA, Dpto. Tec. Alimentos, Ctra. De la Coruña, km 7.5, 28040. Madrid. muino.iria@inia.es.

²UCM, Fac. Vet. Dpto. Prod. Animal, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid. ³UCM, Fac. Vet. Dpto. Fisiol. Animal (Biol.), Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid

INTRODUCCIÓN

Con el fin de mejorar la relación PUFA/SFA de la carne de rumiante, la suplementación de la dieta de los animales con ácidos grasos ω 3 resulta una estrategia efectiva. Sin embargo, la oxidación de los PUFA puede provocar la aparición de compuestos que causen el deterioro de la calidad de la carne con olores y sabores desagradables, por este motivo, se hace necesario el empleo de antioxidantes. La vitamina E es el antioxidante más utilizado en alimentación animal por sus resultados positivos en el mantenimiento de la calidad de la carne. Junto a ella, los polifenoles son un grupo muy amplio de antioxidantes naturales que se están empleando en los últimos tiempos por contar con una gran capacidad antioxidante además de propiedades antimicrobianas. Los polifenoles se están empleando en alimentación animal, sin embargo, los resultados no están claros de momento. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto que la suplementación de la dieta de corderos con vitamina E o con extracto de vino tinto rico en polifenoles puede tener sobre la calidad microbiológica y sensorial de su carne enriquecida en ácidos grasos ω 3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 corderos Manchegos con un peso inicial de $14,3 \pm 0,5$ kg que se asignaron aleatoriamente a una de las tres dietas. La dieta basal estuvo enriquecida en ácidos grasos ω -3 mediante el uso de lino extrusado (6%) y aceite de pescado (1%), manteniéndose como control (C). La segunda dieta estuvo suplementada con 900 ppm de extracto de vino tinto (Provinols[®], Seppic S.A., Francia) (EVT) y la última dieta suplementada con 300 ppm de acetato de α -tocoferol (DSM Nutritional Products Iberia S.A., España) (VE). Según la especificación del fabricante la composición de polifenoles del extracto de vino era proantocianidinas y sus monómeros, catequinas y epicatequinas en una riqueza del 38 % de polifenoles. Los animales se alojaron en boxes individuales y el agua y las dietas experimentales fueron ofrecidas *ad libitum*, controlando semanalmente el alimento consumido. Los corderos se pesaron cada semana hasta que alcanzaron un peso de $26,6 \pm 0,37$ kg, momento en que fueron sacrificados. Después de 24 horas, los costillares fueron chuleteados (2 cm de grosor) y las chuletas se envasaron en MAP (70% O₂/30% CO₂) conservándose en refrigeración (4°C) durante 0, 6 y 12 días. En el día 0 se cuantificó el contenido en α -tocoferol (Cayuela *et al.*, 2003) y polifenoles totales (Singleton y Rossi, 1965) de la carne. En cada tiempo de conservación se realizaron análisis microbiológicos para determinar microorganismos aerobios totales, bacterias ácido lácticas y enterobacterias. En los tiempos de conservación 0 y 6 días se realizó el análisis sensorial mediante un panel entrenado. Se realizó un ANOVA de una vía para los datos productivos y el contenido en α -tocoferol y polifenoles totales de la carne. Los resultados microbiológicos y del análisis sensorial, se analizaron con un procedimiento de medidas repetidas, estudiando el efecto de la dieta (D) como factor fijo y el periodo de conservación (PC) como medida repetida, incluyendo en el modelo la interacción entre ambos (PC*D). Cuando la interacción resultó significativa, las medias se compararon mediante el test de Dunn-Sidák con un nivel de significación $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación a los datos productivos, no se observaron diferencias en el peso vivo (inicial y final), GMD, consumo total de pienso ni en el índice de conversión entre los animales alimentados con las dietas experimentales (Tabla 1). Sin embargo, se ha visto que los

taninos condensados (proantocianidinas) pueden provocar desordenes nutricionales que lleven a los animales a un menor consumo de alimento (Waghorn, 2008). Por lo tanto, el uso de una dosis adecuada de estos compuestos resulta relevante dentro del diseño experimental. El contenido en α -tocoferol en carne estuvo afectado por la dieta ($p < 0,001$) (Tabla 1), así el grupo VE tuvo un contenido 2,3 y 2,5 veces mayor que el grupo C y EV respectivamente. La concentración de vitamina E en la carne del grupo VE fue de 2,45 mg α -tocoferol/kg, que está en concordancia con Álvarez *et al.* (2008), quienes obtuvieron un contenido de 2,17 mg α -tocoferol/kg en carne de cordero alimentados con una dieta suplementada con 270 ppm de vitamina E. El contenido en polifenoles totales en carne no estuvo afectado por la dieta (Tabla 1), presentando un valor medio de 242 μ g GAE/g de carne. Es posible que la dosis empleada o la duración del engorde fueran insuficientes para observar una deposición de compuestos polifenólicos en el músculo, ya que se ha visto que la incorporación 8,96 % de extracto de quebracho (rico en proantocianidinas) en la dieta de corderos durante 60 días resultó en una mayor deposición de polifenoles en carne en comparación con el grupo control (Luciano *et al.*, 2011). La carga bacteriana de la carne no estuvo afectada por la dieta ni por el periodo de conservación (Tabla 2). En la misma línea, Lauzurica *et al.* (2005) no encontraron ningún efecto de la suplementación en la dieta con vitamina E sobre la carga microbiológica de la carne de cordero. La adición directa de extracto de uva a carne no mejoró la calidad microbiológica de la misma durante su conservación (Garrido *et al.*, 2011). En cuanto al análisis sensorial, se ha observado una interacción significativa entre PC y D, ($p < 0,001$) (Figura 1). La carne procedente del grupo VE presentó mayor olor y sabor a cordero y menor olor y sabor a rancio y a pescado a los 6 días de conservación, con respecto a la carne de los grupos C y EVT, obteniendo la mejor valoración global (dato no mostrado). Yang *et al.* (2002) observaron que la carne de vacuno suplementada en la dieta con vitamina E produjo una reducción de olores y sabores desagradables durante la conservación. Al igual que en nuestro caso, O'Grady *et al.* (2006) no observaron ninguna mejora en el olor y sabor de carne de vacuno suplementado en la dieta con 1000 ppm de catequinas del té.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, I., De la Fuente, J., Díaz, M.T., Lauzurica, S., Pérez, C. y Cañeque, V. 2008. *Animal*. 2: 1405-1411 • Cayuela, J.M., Garrido, M.D., Bañón, S.J. y Ros, J.M. 2003. *J. Agr. Food Chem.* 51:1120-1124 • Garrido, M.D., Auqui, M., Martí, N. y Linares, M.B. 2011. *LWT-Food Sci. Technol.* 44: 2238-2243 • Lauzurica, S., De la Fuente, J., Díaz, T.D., Álvarez, I., Pérez, C. y Cañeque, V. 2005. *Meat Sci.* 70: 639-646 • Luciano, G., Vasta, V., Monahan, F.J., López-Andrés, P., Biondi, L., Lanza, M. y Priolo, A. 2011. *Food Chem.* 124: 1036-1042 • O'Grady, M.N., Maher, M., Troy, D.J., Moloney, A.P. y Kerry, J.P. 2006. *Meat Sci.* 73: 132-143 • Singleton, V.L. y Rossi, J.A. 1965. *Am. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158 • Waghorn, G. 2008. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147: 116-139 • Yang, A., Brewster, M.J., Beilken, S.L., Lanari M.C., Taylor, D.G. y Tume, R.K. 2002. *J. Food Sci.* 67: 3309-3313.

Tabla 1. Datos productivos de los corderos y contenido en α -tocoferol y polifenoles totales (\pm error estándar) de su carne según las diferentes dietas: control (C), suplementada con 900 ppm de extracto de vino tinto (EVT) y suplementada con vitamina E (VE).

	C	EVT	VE	Significación
Peso vivo (kg)				
Inicial	14,1 \pm 0,5	14,3 \pm 0,4	14,5 \pm 0,5	ns
Final	26,1 \pm 0,5	26,7 \pm 0,4	26,7 \pm 0,2	ns
GMD (g/día)	321 \pm 20	324 \pm 20	300 \pm 14	ns
Consumo total (kg)	31,8 \pm 1,5	32,9 \pm 2,2	33,1 \pm 1,4	ns
Índice de conversión	2,67 \pm 0,08	2,66 \pm 0,10	2,71 \pm 0,09	ns
Vitamina E (mg α -tocoferol/kg carne)	1,07 \pm 0,22 ^a	1,01 \pm 0,15 ^a	2,45 \pm 0,81 ^b	***
Polifenoles totales (μ g GAE/g carne)	237 \pm 10	222 \pm 26	244 \pm 26	ns

*** $p < 0,001$; ns: no significativo; ^{a,b}. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla 2. Recuentos bacterianos (\log_{10} UFC/cm²) de la carne según las diferentes dietas: control (C), suplementada con 900 ppm de extracto de vino tinto (EVT) y suplementada con vitamina E (VE) durante el periodo de conservación (PC) en MAP (70% O₂/30% CO₂).

	PC Días	Dieta (D) ¹			Significación		
		C	EVT	VE	PC	D	PC*D
Enterobacterias	0	0,50±0,19	0,34±0,18	0,43±0,19			
	6	0,80±0,26	0,38±0,25	0,48±0,26	ns	ns	ns
	12	1,15±0,43	0,84±0,41	0,89±0,43			
Ácido lácticas	0	0,25±0,21	0,40±0,20	0,22±0,21			
	6	0,99±0,21	0,14±0,20	0,09±0,21	ns	ns	ns
	12	0,28±0,21	0,26±0,20	0,05±0,21			
Aerobios totales	0	1,65±0,26	2,10±0,24	1,77±0,26			
	6	1,96±0,34	1,46±0,32	1,91±0,34	ns	ns	ns
	12	2,58±0,45	2,06±0,42	1,61±0,45			

¹ Media ± error estándar; ns: no significativo

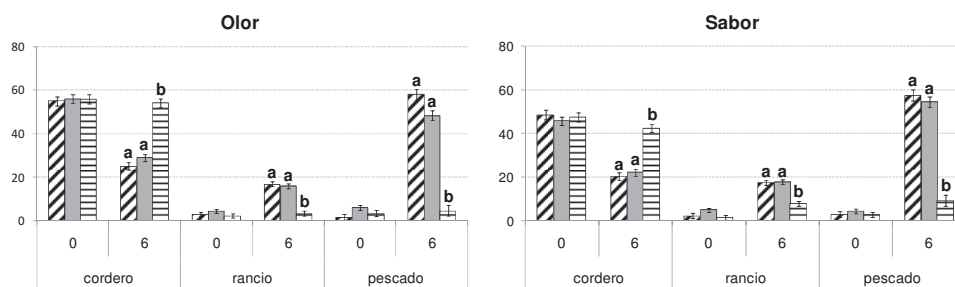


Figura 1. Evolución del olor y sabor a cordero, rancio y pescado de la carne de cordero enriquecida según las diferentes dietas: control ■, suplementada con 900 ppm EVT ■ y suplementada con vitamina E ■ durante el periodo de conservación (0 y 6 días) en MAP (70% O₂/30% CO₂).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RTA2009-00087-C02-01 (INIA) y P2009/AGR-1704 (Comunidad de Madrid). Los autores agradecen la asignación de una beca FPI-INIA a la doctoranda Iria Muño y al CONICITY-Chile por la concesión de la beca predoctoral a Elizabeth Apeleo.

EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH EITHER, RED WINE EXTRACT OR VITAMIN E, IN COMBINATION WITH OMEGA 3 SOURCES ON MICROBIOLOGICAL AND SENSORY QUALITY OF LAMB MEAT

ABSTRACT: The effect of dietary supplementation with 900 ppm of red wine extract (EVT group), 300 ppm of α -tocopheryl acetate (VE group) or without antioxidant supplementation (C group) in combination with omega 3 sources (6% extruded linseed and 1% fish oil) on the lamb meat quality during the storage period (PC) (6 and 12 days) in MAP (70% O₂/30% CO₂) was studied. The dietary supplementation did not affect the productive performance of the animals. The α -tocopherol content on meat was affected by dietary supplementation ($p < 0.001$) being greater in the VE group. The total polyphenolic content was not affected by dietary supplementation. The bacterial load was not affected by dietary supplementation or storage period. There was an interaction between dietary supplementation and storage period ($p < 0.001$) for odour and flavour scores. The meat from VE showed higher lamb odour and flavour and lower rancid and fish odour and flavour than meat from EVT and C groups over storage period.

Keywords: antioxidants, storage, bacterial load, sensory evaluation

LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE SOJA AUMENTA LA GRASA EN LECHE Y MEJORA EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN CABRAS BAJO ESTRÉS TÉRMICO

Hamzaoui, S., Salama, A.A.K., Caja, G., Albanell, E. y Such, X.

Grup de Recerca en Remugants (G2R), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra. ahmed.salama@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El estrés térmico (ET) es importante en rumiantes lecheros porque repercute negativamente en muchos de sus parámetros productivos. Se manifiesta con un aumento de la temperatura corporal y del ritmo respiratorio (West, 2003), produciendo descensos tanto de la ingestión como de la producción de leche en vacas (Baumgard et al, 2006) y cabras (Hirayama et al., 2004). Los primeros resultados de la respuesta de cabras Murciano-Granadinas a condiciones ET a final (Hamzaoui et al., 2011) o mitad de lactación (Hamzaoui et al., 2012), indican disminuciones de la producción de leche (-3 a -9%) y de los contenidos en grasa (0 a -12%) y proteína (-13%), respectivamente, respecto a cabras en termo-neutralidad (TN). Entre las posibles estrategias para aliviar los efectos del ET se puede aumentar la densidad energética de la ración, utilizando mas concentrado o suplementando con grasa. Por otro lado, Bouattour et al. (2008) indicaron que, la adición de aceite de soja a la ración de cabras lecheras, aumentó el contenido en grasa y ácido linoleico conjugado (CLA) en la leche. No se dispone de información sobre los efectos de la suplementación con grasa en cabras bajo condiciones de ET. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con aceite de soja sobre la producción de leche y su perfil de ácidos grasos (AG) en cabras Murciano-Granadina estresadas térmicamente a mitad de lactación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 cabras lecheras múltiparas de raza Murciano-Granadina a mitad de lactación (99 ± 1 d en lactación, 2.00 ± 0.04 L/d producción de leche, 42.8 ± 1.3 kg PV) previamente adaptadas a jaulas metabólicas que fueron situadas en una cámara climática ($4 \times 6.2 \times 3.6$ m; ETS Lindgren-Euroshield Oy, Eura, Finlandia; equipada con calentador Airlan y humidificador Hygrometrik), o en el interior de una nave climatizada. El diseño experimental consistió en un cuadrado latino 4×4 con cuatro períodos de 21 d cada uno (adaptación, 14 d; medidas, 5 d; transición entre periodos, 2 d). Las cabras se asignaron a uno de los 4 tratamientos según un arreglo factorial 2×2 . Los factores experimentales fueron:

1) Ambiente:

- Condiciones de termo-neutralidad (TN): temperatura de 15-20°C y humedad natural durante todo el día 24 h. Fotoperiodo día-noche de 12-12 h.
- Condiciones de estrés térmico (ET): temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C durante el día (9:00-21:00 h) y $30 \pm 0,5$ °C durante la noche (21:00-9:00 h). Día-noche de 12-12 h.

2) Ración:

- Control (C)
- Suplementada con 4% de aceite de soja (S)

Lo que resultó en 4 tratamientos: TN-C, TN-S, ET-C y ET-S. La temperatura y humedad se registraron cada 10 min utilizando un data logger (Opus 10, Lufft, Fellbach, Alemania). Las cabras se ordeñaron 1 vez/d mediante un equipo portátil (Westfalia-Surge, Granollers, Barcelona) a 40 kPa, 90 ppm y 60%.

La ración consistió en una ración total mezclada (alfalfa deshidratada, 43,6%; harina de maíz, 26,3%; harina de cebada, 6,3%; cascarilla de soja, 7,9%; harina de soja, 10,4%; melaza de caña, 3%; bicarbonato sódico, 0,7%; carbonato cálcico, 0,7%; complejo mineral-vitamínico, 0,6%; sal, 0,3%; fosfato bicálcico, 0,2%). El aceite de soja se añadió diariamente y se recogieron muestras diarias representativas de las raciones para su análisis según AOAC (2003).

A lo largo del experimento, se midió diariamente la producción de leche, ingestión de MS, consumo de agua, así como la temperatura rectal (TR) y el ritmo respiratorio (RR) a las 8, 12 y 17 h). Semanalmente se tomaron muestras de leche para el análisis de composición mediante NIRS (Foss NIRSystems 5000, Foss, Hillerød, Dinamarca). En el d 3 de medida (d 17 de cada periodo) se recogieron 50 mL de leche individualmente, en la que se separó la grasa por centrifugación a $6000 \times g$ durante 30 min y se congeló a -80°C hasta el análisis

del perfil de AG mediante cromatografía de gases según Bouattour *et al.* (2008). Los datos fueron analizados con el PROC MIXED de SAS v.9.1.3 para medidas repetidas. El modelo incluyó como efectos fijos las condiciones ambientales (ET vs. TN) y la ración (C vs. S), su interacción y el error residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo del experimento, las cabras ET registraron valores de TR y RR mas altos ($P < 0,001$) que las cabras TN (Tabla 1), evidenciando una situación de estrés térmico de acuerdo con las condiciones experimentales. El aumento de RR (el triple) es un mecanismo habitual para disipar el calor corporal bajo condiciones ET (Rhoads *et al.*, 2009).

La ingestión se redujo un 38% ($P < 0,001$) por efecto del ET (independientemente de la suplementación con el aceite de soja. La reducción de ingestión bajo condiciones ET ya había sido señalada anteriormente en cabras (Sano *et al.*, 1985), ovejas (Abdalla *et al.*, 1993) y vacas lecheras (Rhoads *et al.*, 2009) y se considera como una estrategia del animal para reducir el calor metabólico producido (Kadzere *et al.*, 2002). Por otro lado, las cabras ET doblaron su consumo de agua ($P < 0,001$) respecto a las cabras TN, como mecanismo de compensación de la pérdida de agua por sudoración y por la respiración (jadeo).

Por otro lado, las cabras en ET produjeron -9% ($P < 0,05$) de leche en comparación con las cabras TN, análogamente a lo observado por Hamzaoui *et al.* (2012) en cabras lecheras de similar estado de lactación, pero muy inferior a la pérdida del 45% observada en vacas lecheras (Rhoads *et al.*, 2007).

La suplementación con aceite de soja no afectó a la TR, RR, ni a la producción de leche (Tabla 1), de acuerdo con lo indicado por Bouattour *et al.* (2008).

Tabla 1. Respuesta de cabras lecheras a la ración control (C) o suplementada con 4% aceite de soja (S) en condiciones de termo-neutralidad (TN) o de estrés térmico (ET)

Ítem	TN		ET		ESM ¹	Efecto ($P <$)		
	C	S	C	S		Amb.	Ración	A×R ²
Temperatura rectal, °C	38,63 ^a	38,67 ^a	39,57 ^b	39,70 ^b	0,093	0,001	0,351	0,560
Ritmo respiratorio, r/min	34 ^a	35 ^a	111 ^b	113 ^b	4	0,001	0,705	0,704
Variación de PV, kg	+3,49 ^a	+2,65 ^a	-2,08 ^b	-2,28 ^b	0,97	0,001	0,597	0,745
Ingestión, kg MS/d	2,26 ^a	2,26 ^a	1,47 ^b	1,34 ^b	0,09	0,001	0,490	0,471
Consumo de agua, L/d	6,4 ^a	6,0 ^a	10,6 ^b	12,0 ^b	0,05	0,001	0,655	0,386
Leche, L/d	1,88 ^a	1,99 ^a	1,79 ^b	1,75 ^b	0,11	0,013	0,606	0,231
Leche 3,5%, L/d	2,17 ^a	2,31 ^a	1,86 ^b	2,10 ^{ab}	0,13	0,004	0,035	0,560
NEFA sangre, mmol/L	0,064 ^a	0,108 ^b	0,084 ^a	0,116 ^b	0,017	0,380	0,025	0,730
Composición de leche, %								
Grasa	3,98 ^a	5,07 ^b	3,64 ^a	4,85 ^b	0,14	0,180	0,001	0,781
Proteína	3,40 ^a	3,40 ^a	2,85 ^b	2,96 ^b	0,07	0,001	0,561	0,570
Lactosa	4,51 ^a	4,66 ^a	4,30 ^b	4,43 ^b	0,05	0,004	0,057	0,858
Ácidos grasos leche ³ , %								
<C16	37,4 ^a	29,7 ^b	34,0 ^c	23,4 ^d	0,82	0,001	0,001	0,092
C16 + C16:1	39,2 ^a	26,3 ^b	31,2 ^c	22,6 ^d	1,36	0,001	0,001	0,142
>C16	22,9 ^a	43,6 ^b	34,0 ^c	53,6 ^d	1,40	0,001	0,001	0,704
CLA ⁴	0,47 ^a	2,17 ^b	0,37 ^a	1,95 ^b	0,38	0,686	0,001	0,875

¹Error estándar de las medias. ²Interacción Ambiente × Ración. ³Perfil ácidos grasos (AG) mediante FAME: <C16, AG sintetizados de novo en la glándula mamaria; >C16, AG transferidos de la sangre; C16 +C16:1, AG de novo y transferidos. ⁴Ácido linoleico conjugado (C18:2 *cis*-9 *trans*-11).^{a,b,c,d} medias con letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Debido a la reducción de la ingestión de MS y la disminución moderada en la producción de leche, las cabras ET perdieron 104 g/d de su PV, mientras que las cabras TN ganaron 146 g/d ($P < 0,001$). La suplementación con S no modificó la variación de peso de las cabras. Donde sí se observó un marcado efecto de S fue en la grasa de la leche. Las cabras TN y ET respondieron de manera similar con un aumento del 30% ($P < 0,001$) en la grasa de leche. Sin embargo, el porcentaje de proteína en leche se redujo por el efecto del ET (-15%; $P < 0,05$), pero no se detectó ningún efecto de S. Los AG sintetizados total (<C16) o parcialmente (C16 + C16:1) por la glándula mamaria (de novo), se redujeron por los efectos de ET y de S, mientras que para los AG de cadena larga (>C16), transferidos desde la sangre, el efecto fue el contrario. El aceite de soja contiene AG de cadena larga e insaturados, lo que explicaría el aumento de estos AG en la leche de cabras suplementadas con aceite. No está clara la razón del aumento de los >C16 en las cabras ET, ya que los niveles de NEFA en sangre no variaron entre TN y ET, pero podría ser debido a un cambio en la bihidrogenación en el rumen. La ración S incrementó el contenido de CLA en la leche de TN (+361%) y ET (+427%), lo que es favorable para el consumo humano. En conclusión, el ET redujo la ingestión, la producción lechera y la proteína en leche. La suplementación con aceite de soja aumentó la grasa en leche con la misma magnitud en cabras bajo condiciones TN y ET. La leche de cabras alimentadas con aceite soja contuvo más CLA y más ácidos grasos de cadena larga.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, E.B., Kotby, E.A. & Johnson, H.D. 1993. Small Rumin. Res. 11:125-134.
- AOAC. 2003. Vol. I. 17th ed. Maryland, USA.
- Baumgard, L.H., Odens, L.J., Kay, J.K., Rhoads, R.P., VanBaale, M.J. & Collier, R.J. 2006. Proc. Southwest Nutr. Conf. 181-187
- Bouattour, M.A., Casals, R., Albanell, E., Such, X. & Caja, G. 2008. J. Dairy Sci. 91:2399-2407.
- Hamzaoui, S., Salama, A.A.K., Caja, G., Albanell, E., Such, X. & Flores, C. 2011. XIV Jornadas AIDA Prod. Animal, tomo I, pp. 106-108.
- Hamzaoui, S., Salama, A.A.K., Caja, G., Albanell, E., Flores, C. & Such, X. 2012. J. Dairy Sci., 95(Suppl.2): 672-673
- Hirayama, T., Katoh, K. & Obara, Y. 2004. Anim. Sci. J. 75:237-243.
- Kadzere, C. T., Murphy, M.R., Silanikove N. & Maltz, E. 2002. Livest. Prod. Sci. 77:59-91.
- Rhoads, M.L., Rhoads, R.P., Sanders, S.R., Carroll, S.H., Weber, W.J., Crooker, B.A., Collier, R.J., VanBaale, M.J. & Baumgard, L.H. 2007. J. Dairy Sci. 90(Suppl.1):230.
- Rhoads, M.L., Rhoads, R.P., VanBaale, M.J., Collier, R.J., Sanders, S.R., Weber, W.J., Crooker, B.A. & Baumgard, L.H. 2009. J. Dairy Sci. 92:1986
- Sano, H., Ambo, K. & Tsuda T. 1985. J. Dairy Sci. . 68:2557-2564.
- West, J.W. 2003. J. Dairy Sci. 86:2131-2144.

Agradecimientos: Proyecto AGL-2009-09376 (Plan Nacional I+D+i) y beca FPI a S. Hamzaoui.

SUPPLEMENTATION WITH SOYBEAN OIL INCREASES MILK FAT AND IMPROVES THE FATTY ACID PROFILE IN HEAT-STRESSED DAIRY GOATS

ABSTRACT: The objective was to evaluate the response of dairy goats to soybean oil (SBO) supplementation under thermal-neutral (TN) or heat stress (HS) conditions. Eight multiparous Murciano-Granadina dairy goats kept in metabolic cages were used in 4×4 Latin square (4 periods; 21 d each). Factors were: 1) TN (15 to 20°C), 2) HS (12 h/d at 37°C and 12 h/d at 30°C), 3) control diet (C), and 4) diet supplemented with 4% SBO. Feed intake, milk yield, water consumption, rectal temperature (RT), and respiration rate (RR) were recorded daily. Milk samples were collected for composition and fatty acid profile. Compared to TN, HS goats had lower ($P < 0.01$) feed intake, milk yield, and milk protein. Water consumption, RT, and RR increased ($P < 0.001$). The SBO increased milk fat by more than 30% and CLA by more than 360%. The SBO supplementation increased milk fat with the same magnitude regardless the ambient temperature. The milk of goats fed SBO contained more CLA and long chain fatty acids than that of C goats.

Keywords: Heat stress, soybean oil, milk fatty acids, dairy goat

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ÁCIDO CARNÓSIKO A LA DIETA DE CORDEROS LECHALES SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA CARNE

Morán, L.^{1*}, Giráldez, F.J.¹, Mateo, J.², Blanco, C.¹, Soto, S.³ y Andrés, S.¹

* Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León). Finca Marzanas, E-24346 Grulleros, León (Spain). E-mail: laramoran@eae.csis.es

INTRODUCCIÓN

La carne de cordero lechal, por sus características de color, ternera, jugosidad y flavor es muy apreciada en España y otros países mediterráneos (Bernabéu y Tendero, 2005). La oxidación lipídica (OL) es uno de los principales factores que determinan la vida útil de la carne no sólo por su evidente papel en el deterioro de las cualidades organolépticas, sino también debido a su implicación en la aparición de oxisteroles (Ox), relacionados con la desarrollo de la aterosclerosis (Leonarduzzi *et al.*, 2002). Una de las alternativas para reducir la OL podría ser incluir directamente antioxidantes naturales en la alimentación animal, puesto que la tendencia de consumo actual opta por productos con una imagen "natural". En esta línea el romero incluido en la dieta de las madres ha mostrado un claro efecto antioxidante sobre carne de cordero lechal (Nieto *et al.*, 2011; Nieto *et al.*, 2010), siendo sus propiedades atribuidas al diterpeno fenólico denominado ácido carnósico (Moñino *et al.*, 2008). No obstante, no hay datos sobre la efectividad de este compuesto incluido directamente en la dieta de corderos alimentados con lactoreemplazante. Por tanto el objetivo del presente estudio es determinar si la inclusión de ácido carnósico (a la dosis empleada) en la dieta de corderos lechales alimentados con lactoreemplazante incrementa la estabilidad oxidativa de la carne y comparar su efecto con el producido por la inclusión de vitamina E.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 24 corderos Assaf (peso vivo (PV) 5,95±0,766) separados de sus madres al nacer. Tras dos días de adaptación a la dieta compuesta por lactoreemplazante (LR, formulado sin butilhidroxitolueno antioxidante empleado en la fabricación de LR) *ad libitum* (amamantadora automática) los corderos fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos: grupo control (CTRL n=8), alimentado con LR sin aditivos; grupo carnósico (CARN n=8) alimentado con LR, suplementado con ácido carnósico (0,096 g por kg de PV); y grupo vitamina E (VITE n=8), LR suplementado con α -tocoferol acetato (0,024 g por kg de PV). Para suministrar los tratamientos, diariamente se les separaba de la amamantadora durante 1 hora y posteriormente se les suministraba el suplemento correspondiente diluido en LR, utilizando biberón.

Los corderos fueron sacrificados al alcanzar los 11,5±0,50 kg de PV. La canal se mantuvo 24h a 4°C, tras este tiempo se extrajeron los músculos *gluteus medius* (GM) y cada uno de ellos se cortó en 3 filetes iguales, que fueron dispuestos al azar en bandejas de polipropileno selladas con film (cloruro de polivinilo de permeabilidad al oxígeno 580 ml m⁻² h⁻¹) y almacenadas en condiciones comerciales (12h diarias de iluminación y 3±1°C). Tras 0, 7 y 14 días se retiró un filete al azar de cada bandeja para determinar el contenido en sustancias reactivas del ácido barbitúrico (TBARs). El día 7 de almacenamiento se retiró un filete adicional para el análisis de oxisteroles.

La determinación de TBARs se realizó utilizando la técnica descrita previamente en Morán *et al.* (2012). El análisis de OXs se realizó en las muestras cocinadas tras 7 días de almacenamiento, debido a que el cocinado es el principal responsable de la generación de oxisteroles (Paniangvait *et al.*, 1995). El cocinado se realizó utilizando un grill doble precalentado a 220°C hasta que la temperatura interna de la carne alcanzó los 70°C. Tras enfriar la carne (4°C durante 30 minutos), se liofilizó (Grau *et al.*, 2001). Para obtener los OXs inicialmente se extrajeron los lípidos según el procedimiento descrito por Aldai *et al.* (2010), seguidamente la fracción lipídica se sometió a saponificación y purificación (Guardiola *et al.*, 1995). Los OXs obtenidos se derivatizaron y analizaron mediante cromatografía de gases (Guardiola *et al.*, 1995). La identificación de los distintos oxisteroles se realizó mediante comparación de los tiempos de retención obtenidos con el tiempo de retención del estándar de cada oxisterol y la cuantificación por comparación del área de cada pico con la del estándar interno, en nuestro caso 19-hidroxicolesterol.

Los datos de TBARs fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza de dos vías, considerando el tratamiento administrado (tipo de antioxidante) y los días de almacenamiento como fuente de variación. El contenido en OXs se analizó mediante un anova de una vía con el tratamiento como única fuente de variación, en ambos casos se utilizó el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de malondialdehído (MDA) se suele utilizar como medida directa del nivel de oxidación de la carne puesto que es el principal metabolito de la peroxidación lipídica. La figura 1 muestra la concentración de MDA en las muestras de GM a distintos días de almacenamiento. En general, los valores de OL detectados pueden considerarse bajos en comparación con los obtenidos en otros estudios en los que los corderos fueron amamantados de forma natural (Nieto *et al.*, 2011). Esta diferencia podría deberse a una mayor estabilidad oxidativa en corderos amamantados con LR (Osorio *et al.*, 2008) probablemente por dos motivos: la presencia de Vitamina E (60 mg kg⁻¹ de LR), y un mayor nivel de saturación de las grasas en corderos alimentados con LR. Como cabría esperar el contenido de MDA se incrementó en el grupo control a medida que se prolongó el periodo de almacenamiento. Esta misma evolución se observó en el grupo CARN, pero no en el grupo que recibió el LR suplementado con vitamina E, en el cual no varió el contenido en MDA con el tiempo de almacenamiento. Cabe señalar además que en el día 14 se observaron diferencias significativas entre tratamientos, mostrando el grupo CTRL el valor más alto y el grupo VITE el valor más bajo.

Estudios previos en corderos de cebo suplementados con ambos antioxidantes mostraron su efectividad reduciendo el contenido en oxisteroles en carne cocinada (Morán *et al.*, 2012). En consonancia, en el presente estudio el contenido en OX totales también tendió a reducirse (P<0,075) en el grupo VITE respecto al grupo CTRL, en gran medida debido a la reducción (P<0,049) de 7 α -hidroxicolesterol (Tabla 1). Los valores obtenidos para el grupo CARN mostraron niveles intermedios al igual que sucedió en los valores de TBARs. A pesar de que las diferencias observadas no alcanzaron la significación estadística es oportuno destacar la existencia de una menor concentración de colestanoetriol y 25-hidroxicolesterol en los grupos suplementados con antioxidantes debido a que ambos son los OXs con mayor potencial aterogénico (Peng *et al.*, 1985 y Taylor *et al.*, 1979).

En conclusión la inclusión de ácido carnósico en la dieta de corderos lechales amamantados con LR a la dosis empleada no ejerce un efecto claro sobre la oxidación lipídica y la formación de OXs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldai, N., Dugan, M. E. R., & Kramer, J. K. G. (2010). *J. Food Comp. Anal.* 23(4), 326-332.
- Bernabéu, R., & Tendero, A. (2005). *Meat Sci.* 71(3), 464-470.
- Grau, A., Codony, R., Grimpa, S., Baucells, M., & Guardiola, F. (2001). *Meat Sci.* 57(2), 197-208.
- Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M., & Boatella, J. (1995). *J. Chromatogr. A.* 705(2), 289-304.
- Leonarduzzi, G., Sottero, B., & Poli, G. (2002). *J. Nutr. Biochem.* 13(12), 700-710.
- Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J., Lafuente, A., & Jordán, M. (2008). *J. Agric. Food. Chem.* 56(9), 3363-3367.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Prieto, N., & Giráldez, F. J. (2012). *Meat Sci.* 91(4), 430-434.
- Nieto, G., Estrada, M., Jordán, M. J., Garrido, M. D., & Bañón, S. (2011). *Food Chem.* 124(4), 1423-1429.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010). *Meat Sci.* 84(1), 23-29.
- Osorio, M. T., Zumalacárregui, J. M., Cabeza, E. A., Figueira, A., & Mateo, J. (2008). *Small Ruminant Res.* 78(1), 1-12.
- Paniangvait, P., King, A., Jones, A., & German, B. (1995). *J. Food. Sci.* 60(6), 1159-1174.
- Peng, S., Taylor, C., Hill, J., & Morin, R. (1985). *Atherosclerosis.* 54(2), 121-133.
- Taylor, C., Peng, S., Werthessen, N., Tham, P., & Lee, K. (1979). *Am. J. Clin. Nutr.* 32(1), 40-57.

Agradecimientos: al Ministerio de Economía y Competitividad y Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la financiación aportada (Proyecto 201240E105) y al programa del CSIC Junta para la Ampliación de Estudios por la concesión de la Beca JAE-Predoc a Lara Morán.

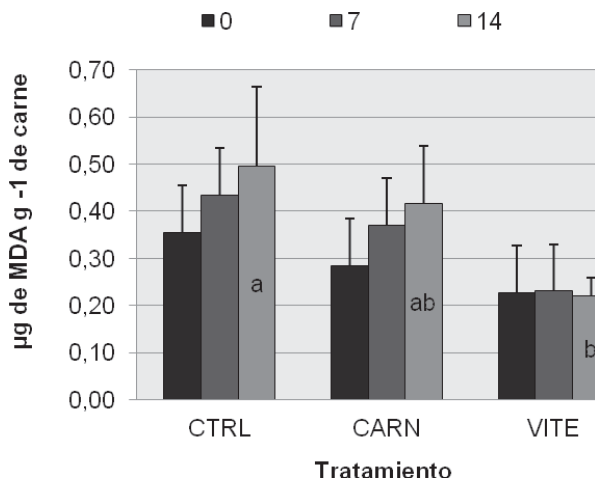


Figura 1. Medias \pm error estándar para TBARs (μg MDA por g de gluteus medius) tras 0, 7 y 14 días de almacenamiento. CTRL (grupo sin antioxidantes); CARN (0,096 g de ácido carnósico por kg de peso vivo); VITE (0,024 g de α -tocoferol acetato por kg de peso vivo). a, b, c superíndices distintos en el mismo día indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0,05$).

Tabla 1. Contenido en oxisteroles (ng por g de gluteus medius) en muestras de carne cocinada tras 7 días de almacenamiento.

	CTRL	CARN	VITE	sed	p-value
7 α -hidroxicolesterol	1,74 ^a	0,96 ^{ab}	0,84 ^b	0,278	0,049
7 β -hidroxicolesterol	2,07	1,87	1,16	0,522	0,377
5,6 α -epoxicolesterol	2,48	2,08	2,12	0,404	0,629
5,6 β -epoxicolesterol	0,74	0,81	0,75	0,199	0,942
colestanetriol	0,38	0,06	0,20	0,134	0,115
25-hidroxicolesterol	0,14	0,02	0,08	0,053	0,115
7-cetocolesterol	2,42	1,69	1,30	0,628	0,385
Oxisteroles totales	10,2	6,08	5,48	1,594	0,075

CTRL (grupo sin antioxidantes); CARN (0,096 g de ácido carnósico por kg de peso vivo); VITE (0,024 g de α -tocoferol acetato por kg de peso vivo). Distintos superíndices (^{a, b}) indican diferencias significativas entre tratamientos. ($P < 0,05$)

EFFECT OF CARNOSIC ACID INCLUDED IN THE DIET OF SUCKLING LAMBS ON THE OXIDATIVE STABILITY OF MEAT

ABSTRACT: Assaf suckling lambs (32) fed milk replacer (MR) *ad libitum* were supplemented with: no additives (CTRL group n=8), carnolic acid at 0,096 g kg⁻¹ live weight (LW) (CARN group n= 8), or vitamin E at 0.024 g kg⁻¹ LW (VITE group n=8) were used to assess the effect of these antioxidant compounds on oxidation stability. The animals were slaughtered at reached intended body weight and *gluteus medius* muscles were extracted for thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), cholesterol oxidation products or oxysterols (OXs) determination, sliced, packed and kept at 4 °C for 14 days. Results indicated that the VITE group showed significantly lower levels of malondialdehyde (at day 14 of storage) and the 7 α -hydroxycholesterol production when compared to the CTRL group, showing CARN group intermediate levels.

Keywords: Carnolic acid, oxysterols, TBARs, suckling lambs.

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA DE CORDEROS LECHALES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CARNE ALMACENADA CRUDA Y COCINADA

Morán, L.*, Giráldez, F.J., Mateo, J., Blanco, C., Soto, S. y Andrés, S.

*Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León). Finca Marzanas, E-24346 Grulleros, León (Spain). E-mail: laramoran@eae.csis.es

INTRODUCCIÓN

La oxidación lipídica de la carne da lugar a la formación de compuestos volátiles, los cuales generan aromas y sabores que provocan el rechazo del producto por parte del consumidor. Su control mediante la adición de antioxidantes parece ser una opción realmente eficaz. En este sentido, estudios previos realizados en corderos de cebo suplementados con ácido carnósico (fenol diterpénico procedente del romero) han mostrado un incremento de la estabilidad oxidativa de la carne (Morán *et al.*, 2012a y 2012b), por lo que la incorporación de antioxidantes en la propia dieta de los animales parece ser una alternativa eficaz. No obstante, en corderos lechales alimentados con lactorreemplazante no existen datos al respecto. Por tanto, el objetivo de este estudio fue estudiar el efecto de la inclusión de ácido carnósico en la dieta de corderos lechales sobre la producción de compuestos volátiles procedentes de la autoxidación lipídica de la carne.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 24 corderos Assaf (peso vivo (PV) $5,95 \pm 0,766$) separados de sus madres al nacer. Tras dos días de adaptación a la dieta compuesta por lactorreemplazante (LR, formulado sin butilhidroxitolueno) *ad libitum* (amamantadora automática) los corderos fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos: grupo control (CTRL n=8), alimentado con LR sin aditivos; grupo carnósico (CARN n=8) alimentado con LR suplementado con ácido carnósico (0,096 g por kg de PV); y grupo vitamina E (VITE n=8), que recibía LR suplementado con α -tocopherol acetato (0,024 g por kg de PV). Para suministrar los tratamientos, diariamente se les separaba de la amamantadora durante 1 hora y posteriormente se les administraba el suplemento correspondiente, diluido en LR, utilizando biberón.

Los corderos fueron sacrificados al alcanzar los $11,5 \pm 0,50$ kg de PV. La canal se mantuvo 24h a 4°C. Tras este tiempo se extrajeron los músculos *biceps femoralis* (BF); 1,5 cm de las secciones distal y proximal fueron eliminadas y la parte central fue cortada en filetes de 2 cm de grosor que se asignaron al azar a dos tipos de condiciones de almacenamiento para la determinación de los compuestos volátiles en carne: tradicional y precocinada. Para el análisis de compuestos volátiles en carne almacenada de manera tradicional los filetes de carne fresca se envasaron en bandejas de polipropileno selladas con film (cloruro de polivinilo de permeabilidad al oxígeno $580 \text{ ml m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y almacenadas en refrigeración ($3 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 7 días. Después se extrajo la carne que se cocinó en un doble grill (precalentado a 220°C) hasta que el interior de la carne alcanzó los 70°C (AMSA, 1995), y seguidamente se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) para el análisis de compuestos volátiles. En el segundo caso (almacenado de la carne precocinada) la carne se cocinó en las mismas condiciones que en el caso anterior y posteriormente se envasó en idénticas bandejas y condiciones que la carne en presentación tradicional. Tras 7 días de almacenamiento, en ambos casos, se analizaron los compuestos volátiles empleando la cromatografía de gases en espacio de cabeza acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Para el análisis se utilizaron viales de espacio de cabeza de 20 ml en los cuales se dispusieron 3 g de muestra (picada usando un procesador de carne), 5 ml de agua y 0,07 g de NaCl. Dichos viales fueron sellados y utilizados para el análisis de compuestos volátiles mediante (CG-MS) usando el procedimiento descrito por (Vieira *et al.*, 2012).

El contenido en compuestos volátiles se analizó estadísticamente mediante un anova de una vía con el tratamiento como única fuente de variación, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 1 y 2 representan el contenido (área x 10⁻⁶) en compuestos volátiles carbonílicos obtenidos durante el cocinado de la carne para los dos tipos de almacenamiento evaluados: tradicional (Figura 1) o precocinado (Figura 2). En ambos tratamientos el área representada por los compuestos carbonílicos analizados en espacio de cabeza supuso más del 65% del total.

En la Figura 1 se puede apreciar como los niveles de hexanal, y 2,3-octanodiona detectados en carne almacenada fresca y cocinada tras 7 días de almacenamiento son significativamente más elevados en aquellos animales que habían consumido ácido carnósico en comparación con los animales alimentados con vitamina E. Estos resultados sugieren que, a las dosis empleadas, el ácido carnósico podría tener un efecto pro-oxidante en lo que a compuestos volátiles carbonílicos se refiere. Un efecto similar sobre la producción de volátiles se observó en corderos de cebo alimentados con altas dosis de ácido carnósico (Morán *et al.*, 2012), mientras que dosis más bajas de ácido carnósico en estos animales tenían en efecto antioxidante.

Además, se puede observar que la carne precocinada alcanza a los 7 días de almacenamiento concentraciones de compuestos volátiles mucho mayores que en el caso de la carne almacenada fresca y posteriormente cocinada. Estos resultados coinciden con los de estudios precedentes que aseguran que la carne almacenada cocinada alcanza antes mayores niveles de oxidación que aquella conservada fresca en las mismas condiciones (Gray y Monahan, 1992, Gray y Pearson, 1987 y Haak *et al.*, 2006).

Por último en la Figura 2, correspondiente a los resultados obtenidos en carne cocinada, antes de almacenado puede apreciarse la falta de efecto tanto del ácido carnósico como de la vitamina E, lo que podría ser debido a un efecto inhibitorio como consecuencia del tratamiento térmico.

En conclusión el ácido carnósico a la dosis evaluada en la dieta de los corderos lechales podría ser prooxidante en carne almacenada fresca, mientras que el cocinado de la carne previo al almacenado podría eliminar el efecto de estos compuestos (vitamina E y ácido carnósico) incorporados en la dieta de corderos lechales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMSA (1995). American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board, Chicago, Illinois
- Gray, J. I. y Monahan, F. J. (1992). Trends Food Sci. & Tech., 3, 315-319.
- J.I. Gray, A.M. Pearson A.M. (1987). Advances in meat research, Van Nostrand Reinhold Co, New York (1987), pp. 221–269
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H. y De Smet, S. (2006). Meat Sci., 74(3), 476-486.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Prieto, N. y Giráldez, F. J. (2012a). Meat Sci., 91(4), 430–434.
- Morán, L., Javier Giráldez, F., Panseri, S., Aldai, N., Jordán, M. J., Chiesa, L. M. y Andrés, S. (2012b). Food Chem., (in press)
- Vieira, C., Fernández-Diez, A., Mateo, J., Bodas, R., Soto, S. y Manso, T. (2012). Meat Sci., 91(3) 271-282

Agradecimientos: al Ministerio de Economía y Competitividad y Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la financiación aportada (Proyecto 201240E105) y al programa del CSIC Junta para la Ampliación de Estudios por la concesión de la Beca JAE-Predoc a Lara Morán.

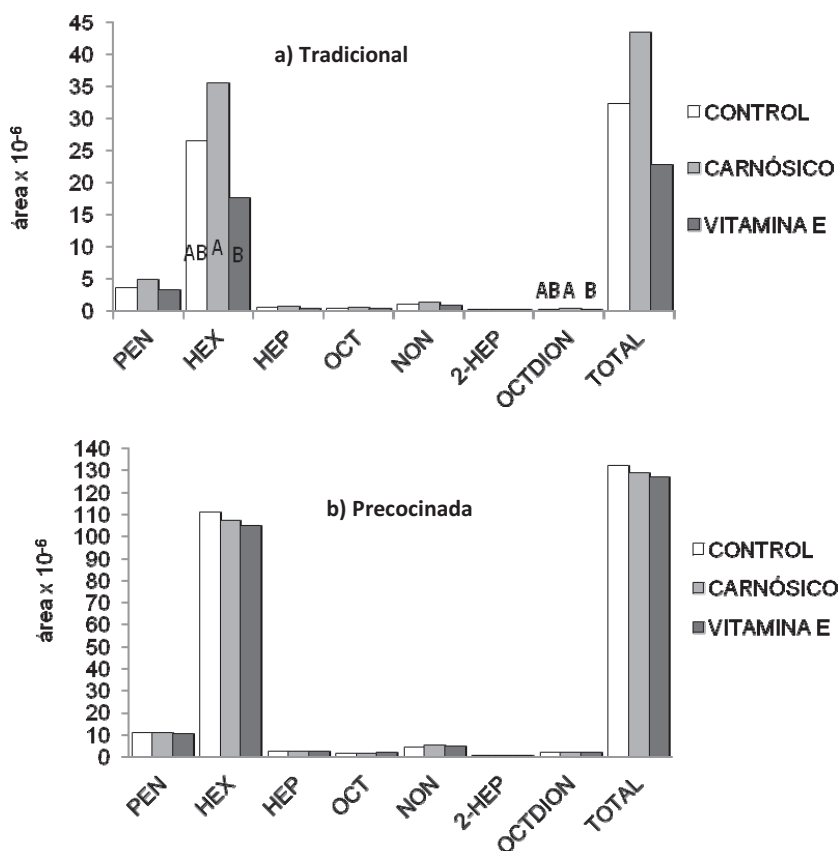


Figura 1. Compuestos volátiles carbonílicos (área $\times 10^6$) detectados en *biceps femoralis* almacenado 7 días en dos presentaciones a) Tradicional y b) Precocinada. (PEN: pentanal, HEX: hexanal, HEP: heptanal, OCT: octanal, NON: nonanal, 2-HEP: 2-hetanona, OCTDION: 2,3-octanodiona) A, B, C superíndices distintos en el mismo día indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

EFFECT OF ANTIOXIDANTS INCLUDED IN THE DIET OF SUCKLING LAMBS ON THE VOLATILE COMPOUNDS PRODUCTION IN RAW OR COOKED STORED MEAT

ABSTRACT: Assaf suckling lambs (24) fed milk replacer (MR) *ad libitum* supplemented with: no additives (CTRL group $n=8$), carnosic acid at 0.096 g kg^{-1} live weight (LW) (CARN group $n=8$), or vitamin E at 0.024 g kg^{-1} LW (VITE group $n=8$) were used to assess the effect of these antioxidant compounds on the production of volatile carbonyl compounds in chill-stored raw or precooked *biceps femoralis* meat for 7 days. On chill-stored raw meat cooked after 7 days dietary supplementation with vitamin E in MR (0.024 g kg^{-1} LW) reduces the production of hexanal and 2,3-octanedione, compounds related with undesirable flavour and lipid oxidation in meat. On the other hand, carnosic acid (0.096 g kg^{-1} LW) showed the opposite effect increasing the production of these compounds. Finally the effects of both, vitamin E and carnosic acid compounds, do not appear on precooked meat maybe because the heat treatment eliminates the activity of these compounds.

COLOR INSTRUMENTAL, APRECIACIÓN VISUAL Y OXIDACIÓN LIPÍDICA DE PECHUGA DE POLLO CONSERVADA EN ENVASES CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y PLATA

Ripoll, G., Albertí, P. y Panea, B.

CITA de Aragón, Avda. Montañana, 930, 50.059, Zaragoza. gripoll@aragon.es

INTRODUCCIÓN

El interés por alargar la vida útil de los alimentos ha crecido en los últimos años debido a que los consumidores buscan productos con una vida útil más larga (Kerry *et al.*, 2006). Los envases activos son aquellos que incorporan aditivos en la formulación del envase con el fin de alargar la vida útil del producto. Entre ellos se encuentran los que secuestran oxígeno, dióxido de carbono u otros gases emitidos por el producto, los que controlan la humedad y los que incorporan tecnología antimicrobiana. Los envases activos con poder antimicrobiano son una nueva generación de envases alimentarios basados en nanocompuestos metálicos, siendo los más comunes son la Ag y el Zn. El Zn tiene acción antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos, mientras que el poder antimicrobiano de la plata se basa en que induce estrés oxidativo en los microorganismos (Emamifar *et al.*, 2010) y en la interrupción de la actividad enzimática de la célula al enlazarse con su membrana (Appendini *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto de la adición de nanopartículas de Ag y de óxido de Zn en dos concentraciones distintas a la formulación del envase sobre el color instrumental, la apreciación visual y la oxidación lipídica de pechuga de pollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron tres tipos de envase para el ensayo, uno control y dos con aditivo. Las bandejas con nanopartículas se fabricaron con polietileno de baja densidad con un 5% o 10 % de pre-mezcla de Ag. Ambos envases incluían un 1% de ZnO. El envase control fue el usado por la empresa comercializadora, una bandeja estándar D2-45 de polietileno y poliéster. Los animales siguieron una dieta estándar y se sacrificaron todos el mismo día. Se tomaron 75 bandejas con dos pechugas por bandeja, 25 bandejas para cada tipo de envase. Las muestras se envasaron con una atmósfera estándar de 70 % O₂, 20 % CO₂ y 10 % de N₂. Las bandejas, previamente numeradas, se colocaron en una cámara frigorífica a 4°C con luz durante 12 horas/día, durante 0 días, 7 días, 10 días, 15 días y 21 días de maduración (5 bandejas por envase y tiempo de conservación). Durante este tiempo, las bandejas se cambiaron de orden todos los días con el fin de igualar al máximo las condiciones de exposición a la luz. El color instrumental de la pechuga se midió con un espectrofotómetro Minolta DM-2600d registrando la luminosidad (L*) y los índices de rojo (a*) y amarillo (b*) del espacio de color CIELab. Después, tres evaluadores entrenados asignaron a cada una de las pechugas una nota de Apreciación visual, en función de la decoloración, manchas y aspecto general de la carne, utilizando para ello una escala de tres puntos: 1 (mala), 2 (regular) o 3 (buena). A los 21 días, el 100% de las muestras fueron valoradas como malas debido al crecimiento microbiano y no se midió el color instrumental de las mismas. Una vez medido el color instrumental y realizada la valoración visual se congeló una porción de pechuga envasada al vacío hasta la realización del análisis de oxidación lipídica, realizado según sigue: 10 g de pechuga limpia de grasa intermuscular se picaron y mezclaron en un tubo "falcon" con 20 ml de 10% ácido tricloroacético usando un homogeneizador Micra D8 homogenizer (Labolan, Spain). Esta mezcla se centrifugó a 1500 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se separó con un papel de filtro. Se mezclaron 2 ml de filtrado con 2 ml de ácido tiobarbitúrico (20 mM). Los tubos se incubaron a 97 °C durante 20 min en agua. Se midió la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro Helios Beta (Thermo Electron Corporation, Spain). La curva estándar de calibración se creó con concentraciones crecientes de 1,1,3,3, tetrametoxipropano al 99%, el precursor del malonaldehído (MDA), 5 ml de ácido tiobarbitúrico y 5 ml de agua y se incubó de forma similar a las muestras. Cada día de análisis se realizó una curva estándar. La oxidación lipídica se expresó en mg de MDA por kg de músculo.

Se realizó un GLM con el programa SAS con el tipo de bandeja y el tiempo de exposición (en adelante, tiempo) como efectos fijos. Las diferencias entre medias se consideraron

significativas cuando $P < 0.05$. Se estudió la relación entre el color instrumental y la apreciación visual mediante la r de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No hubo influencia del envase ($P > 0.05$) sobre el color instrumental de la carne, pero sí del tiempo (Tabla 1). La luminosidad aumentó de 0 a 7 días para mantenerse desde los 7 días hasta los 10 días y volver a aumentar hasta los 15 d. Los índices de rojo y amarillo también aumentaron significativamente de 0 días a 7 días para luego disminuir lentamente. A los 7 días, la pechuga tuvo su máximo color, para luego ir decolorándose. La apreciación visual de las pechugas (Fig. 1) tampoco se vio influida por el envase ($P > 0.05$) pero sí por el tiempo ($P < 0.001$), siendo valorada como buena hasta los 7 días, momento en que empezó a disminuir significativamente. A los 15 días, las muestras fueron valoradas como malas. El límite de aceptabilidad de 2 estaría alrededor de los 13 días de maduración. La apreciación visual estuvo significativamente relacionada con la luminosidad ($r = -0.55$, $P < 0.001$) pero no con los índices de amarillo y rojo. Estos resultados son debidos a que en la apreciación visual se valoraron más atributos que el color instrumental.

En la Figura 2 se muestra la evolución de la oxidación lipídica en el tiempo. Hubo efecto significativo del envase ($P = 0.05$) y del tiempo ($P < 0.001$). La oxidación lipídica aumentó con el tiempo en todos los envases y, aunque el envase E (control) tuvo valores mayores durante casi todo el periodo experimental, sólo fueron significativamente más altos a los 10 días y a los 21 días. De forma similar, el envase adicionado al 10 % se mantuvo con valores menores de oxidación que el envase adicionado al 5% pero las diferencias entre ellos no fueron significativas ($P > 0.05$).

Los envases con nanopartículas de Ag y óxido de Zn no afectaron al color instrumental y apariencia visual de las pechugas, pero tuvieron una ligera influencia disminuyendo la oxidación lipídica, que fue menor en los envases con aditivos que en el control, por lo que podría justificarse su empleo siempre que el coste económico lo haga viable.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). *Inn. Food Sci. & Emerging Tech.*, 3(2), 113-126.
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., & Soleimani-Zad, S. (2010). *Inn. Food Sci. & Emerging Tech.*, 11(4), 742-748.
- Kerry, J. P., O'Grady, M. N., & Hogan, S. A. (2006). *Meat Sci.*, 74(1), 113-130.

INSTRUMENTAL COLOUR, VISUAL APPRAISAL AND LIPID OXIDATION OF CHICKEN BREAST STORED IN SILVER AND ZINC OXIDED NANOCOMPOSITE PACKAGING

ABSTRACT: Chicken breasts were stored in two trays containing 5 % and 10 % of Ag + 1% of ZnO nanocomposite and a standard tray. Instrumental colour (L^* , a^* and b^*), visual appraisal (from 1, bad to 3, good) and lipid oxidation were studied for 0 d, 7 d, 10 d 15 d and 21 d. The 100 % of breast were evaluated as 1 at 21 d and then, instrumental colour was not measured. No significant effect of packaging was detected on instrumental colour and visual appraisal. However, both colour and visual appraisal were significantly influenced by storage time. Breasts were rejected by evaluators around 13 d of storage. Packaging had a slightly influence on lipid oxidation. Standard tray showed a tendency to greater lipid oxidation than 10 % tray.

Keywords: shelf life, visual appraisal, active packaging, nanoparticle

Tabla 1. Influencia del tiempo en el color instrumental

	0 d	7 d	10 d	15 d	e.e.	Sig.
L*	50,4 ^c	54,0 ^b	53,5 ^b	55,9 ^a	0,47	0,000
a*	0,8 ^b	1,4 ^a	1,1 ^{ab}	0,9 ^b	0,15	0,025
b*	1,8 ^b	3,4 ^a	2,0 ^b	2,4 ^b	0,29	0,006

a, b significan diferencias entre tratamientos a un tiempo determinado ($P \leq 0.05$)

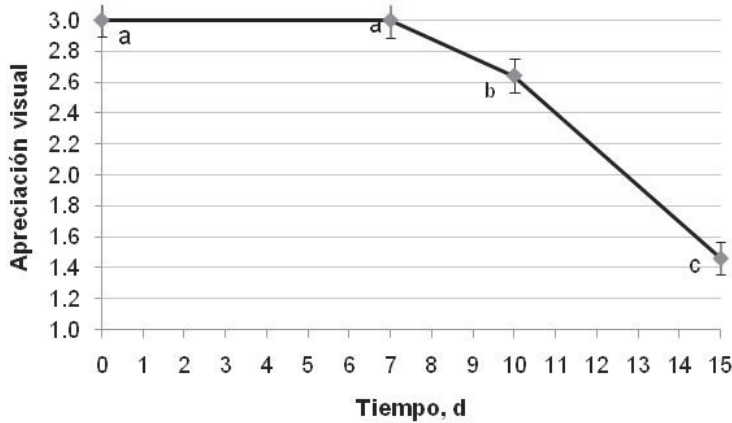


Figura 1. Evolución de la apreciación visual de pechuga de pollo.

1, mala; 2, regular; 3, buena; a, b, c significan diferencias entre tiempos ($P \leq 0.05$)

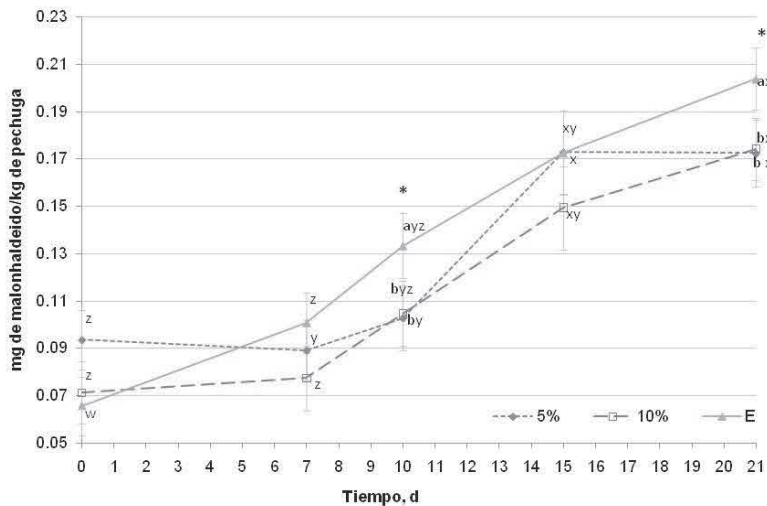


Figura 2. Evolución de la oxidación lipídica de pechuga de pollo.

a, b significan diferencias entre tratamientos a un tiempo determinado ($P \leq 0.05$). w, x, y, z significan diferencias entre tiempos dentro de un tratamiento ($P \leq 0.05$).

VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA COMBINACIÓN DE ZN Y AG USADOS EN DIFERENTE PROPORCIÓN EN LA FORMULACIÓN DE UN ENVASE PARA PECHUGAS DE POLLO

Panea, B., Albertí, P. y Ripoll, G.
CITA. Avda. Montañana, 930, 50.059, Zaragoza. bpaneaa@aragon.es

INTRODUCCIÓN

En la producción de broilers son fundamentales la seguridad alimentaria y la vida útil y para asegurar ambos, es esencial utilizar un envase conveniente. Los envases con nanocompuestos con propiedades antimicrobianas son una nueva generación de envases activos basados en nanocompuestos metálicos, capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos e, incluso, de destruirlos. Los óxidos metálicos como ZnO, TiO₂, MgO y CaO son particularmente interesantes porque son seguros para los humanos (Lin *et al.*, 2009; Stoimenov *et al.*, 2002; Sondi y Salopek-Sondi, 2004). El Zn y la Ag son efectivos inhibidores antimicrobianos pero debido a su coste, las investigaciones más recientes se están orientando hacia el ZnO (Tankhiwale y Bajpai, 2012). El objetivo del presente estudio fue valorar la capacidad antimicrobiana de una combinación de Zn y Ag usados en diferente proporción en la formulación de un envase para pechugas de pollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron tres tipos de envase: el envase control (E) fue una bandeja estándar D2-45 de polietileno y poliéster. Las bandejas con nanopartículas se fabricaron con polietileno de baja densidad con un 5% ó 10 % de pre-mezcla de Ag y un 1% de ZnO. Se estudió *in vitro* el efecto antimicrobiano del plástico (sin alimento) sobre *E. coli*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes* siguiendo la ISO-22196:2007: los envases, con y sin sustancias aditivas, se cortaron en piezas de 5x5 cm², que se inocularon con 0,4 ml de suspensión microbiana, se cubrieron con una pieza de film estéril de 4x4 cm y fueron incubados a 35^o/24 horas. Una muestra de 100 µL de cada uno de los inóculos se sembró en una placa y se incubó a 37 °C durante 24-48 h. Para estudiar el efecto antimicrobiano sobre la carne, se criaron los animales siguiendo una dieta estándar y se sacrificaron todos el mismo día. Se tomaron 75 bandejas con dos pechugas por bandeja, 25 bandejas para cada tipo de envase. Las muestras se envasaron con una atmósfera estándar de 70 % O₂, 20 % CO₂ y 10 de N. Las bandejas, previamente numeradas, se colocaron en una cámara frigorífica a 4°C con luz durante 12 horas/día, durante 0 días, 7 días, 10 días, 15 días y 21 días de maduración (5 bandejas por envase y tiempo). Durante este tiempo, las bandejas se cambiaron de orden todos los días con el fin de igualar al máximo las condiciones de exposición a la luz. Las enterobacterias y los aerobios mesófilos totales se investigaron a los 0, 10, 15 y 21 días de tiempo de conservación (en adelante, tiempo), mientras que las bacterias ácido-lácticas (en adelante, BAL) se contaron a los 7, 10, 15 y 21 días de tiempo. El recuento de enterobacterias se hizo según la ISO 21528-2:2000 (Agar VRBG, 30°C/18-24 horas), el recuento de aerobios según la ISO 4833:2003 (Agar PCA 30°C/ 72 horas) y el recuento de BAL se realizó utilizando Agar MRS incubado a 35°C/3 días o a 30°C/5 días en atmósfera suplementada con un 5% de CO₂. Se realizó un GLM con el tipo de bandeja y el tiempo como efectos fijos. Las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando P<0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad antimicrobiana *in vitro* del plástico (sin alimento), expresada como reducción decimal, fue 7,34 para *E. coli*, 6,74 para *P. aeruginosa* y 4,31 para *L. monocytogenes*, es decir, reducciones decimales superiores a 4 para una concentración de nanopartículas del 0,4%. Según el JIS Z 2801:2000, del que deriva la ISO 22196:2007, el valor de la actividad antimicrobiana en superficies plásticas debe ser superior a 2 para demostrar la eficacia del compuesto. Por lo tanto, las bandejas fabricadas con ZnO + Ag tuvieron efecto antimicrobiano *in vitro*. En los ensayos con pechuga, puede verse que todos los recuentos microbianos aumentaron con el tiempo (Figura 1, P<0,001), independientemente del envase

y fueron siempre mayores en el envase E que en los otros dos ($P < 0,05$). Nuestros recuentos están de acuerdo con los de otros autores. Smolander *et al.* (2004) describen recuentos de 10^4 ufc/g para las BAL al principio del almacenamiento para alcanzar 10^7 ufc/g en los 7 primeros días de envasado y recuentos para enterobacterias de 10^2 ufc/g al principio del almacenamiento para alcanzar 10^6 - 10^8 ufc/g tras 12 días. Similarmente, Voidaru *et al.* (2011) describen recuentos de $\log 4,7$ ufc/g para aerobios totales y Álvarez-Astorga *et al.* (2002) describen recuentos de $\log 5,79$ ufc/g para mesófilos. En España, la única obligación microbiológica para la carne de pollo es la ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra (R CE 1441/2007, R CE 1086/2011). Debido a la ausencia de estándares, Pascual-Anderson (1992) recomiendan un nivel de 10^6 ufc/g para mesófilos, mientras que Sánchez *et al.* (2011) recomienda unos límites de $\log 4,84$ ufc/g para aerobios y de $\log 3,70$ ufc/g para enterobacterias. Estos límites coinciden con los de otros autores, que varían entre 10^6 ufc/g y 10^7 ufc/g para aerobios y 10^2 ufc/g y 10^3 ufc/g para enterobacterias (Wehr 1982, Smolander *et al.*, 2004). Por lo tanto, nuestros recuentos para mesófilos y enterobacterias están por debajo de los límites establecidos por Sánchez *et al.* (2011) durante aproximadamente la primera semana, y que nuestros recuentos para BAL son muy bajos en comparación con los encontrados en la bibliografía (Smolander *et al.*, 2004).

De los resultados encontrados puede concluirse que los envases con nanopartículas de Zn y Ag tienen efecto antimicrobiano, tanto *in vitro* como sobre la carne. Todos los recuentos en carne aumentaron con el tiempo, independientemente del envase y fueron siempre mayores en el envase control. Los resultados demuestran el potencial de este tipo de tecnología y el interés para la industria avícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M.C. 2002. Meat Sci. 62: 45-50.
- Lin, W., Xu, Y., Huang, C.C., Ma, Y., Shannon, K., Chen, D.-R., and Huang, Y.W. 2009. J. Nanoparticle Res. 11: 25-39.
- Pascual-Anderson, M.R. 1992. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Diaz de Santos, Madrid, p.163
- Sánchez, J.A., Serrano, S., Marfil, R., Diz, J., and Jodral, M.L. 2011. Eurocarne 199: 62-68.
- Smolander, M., Alakomi, H.L., Ritvanen, T., Vainionpää, J., Ahvenainen, R. 2004. Food Control 15: 217-229.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. 2004. J. Colloid Interface Sci., 275: 177-182.
- Stoimenov, P.K., Klinger, R.L., Marchin, G.L., Klabunde, K.J. 2002. Langmuir 18: 6679-6686.
- Tankhiwale, R Bajpai, S.K. 2012. Biointerfaces, 90: 16-20.
- Voidaru, C., Vassos, D., Rozos, G., Alexopoulos, A., Plessas, S., Tsinas, A., Skoufou, M., Stavropoulou, E., Bezirtzoglou, E. 2011. Anaerobe 17: 341-343.
- Wher, H.M. 1982. Food Tech. 36: 45-92.

Agradecimientos a la Fundación AITiiP por la fabricación de los envases.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL CAPACITY OF A COMBINATION OF ZN AND AG USED IN DIFFERENT PROPORTIONS IN THE PACK FORMULATION FOR CHICKEN BREAST FILLETS

ABSTRACT: Chicken breasts were stored in two trays containing 5 % and 10 % of Ag + ZnO nanocomposite and a standard tray. Microbial counts was studied *in vitro* an on breast for 0 d, 7 d, 10 d 15 d and 21 d. Trays with nanoparticles have antimicrobial effect both *in vitro* and on meat. Counts for all microbial increased as time did, independently on the tray composition and they were always higher in E trays than in others. Results showed the potentiality and interest of this kind of technology for poultry industries.

Keywords: active packaging, meat quality, microbial, nanoparticle

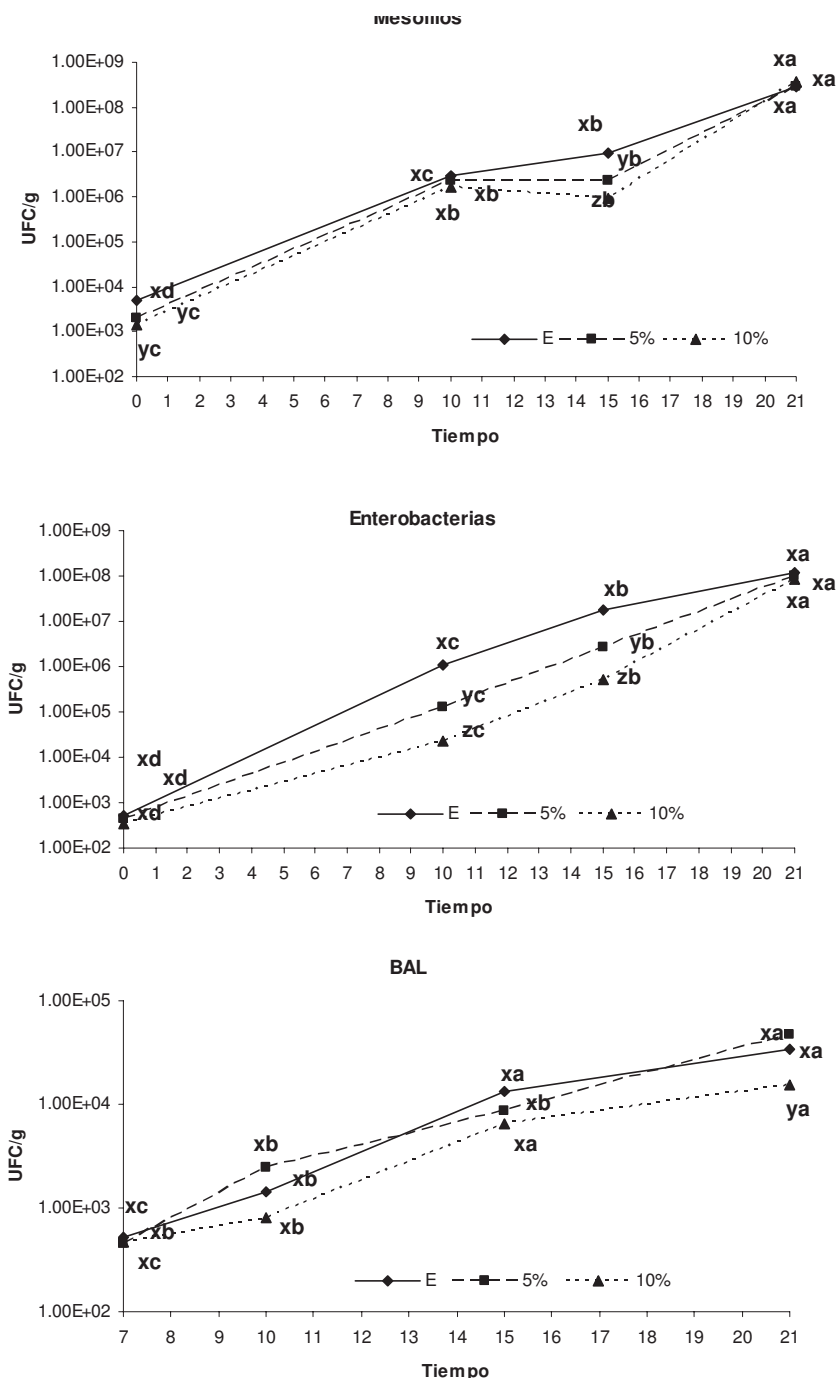


Figura 1. Recuentos microbiológicos (ufc/g) para mesófilos totales, enterobacterias y BAL en pechuga de pollo a lo largo del tiempo de almacenamiento en tres envases de diferente composición química. Letras diferentes (x,y,z) significan diferencias ($P < 0.05$) entre envases para un tiempo de almacenamiento dado. Letras diferentes (a,b,c,d) significan diferencias ($P < 0.05$) entre tiempos de almacenamiento para un envase dado.

CALIDAD Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL LOMO DE CERDO CONGELADO

Alonso, V., Tenas, J., Muela, E., Roncalés, P. y Beltrán, J.A.

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, España. veroalon@unizar.es; jbeltran@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La congelación es la tecnología más frecuentemente utilizada para preservar la carne fresca durante largos periodos de almacenamiento. Mantener la carne almacenada en congelación permite a la industria cárnica (i) adaptar su oferta a la demanda de los consumidores, (ii) ajustar la provisión de carne a la velocidad de procesado, y (iii) transportar la carne a países importadores (Estévez *et al.*, 2011). A pesar de las ventajas de la congelación de la carne fresca, la carne congelada tiene una mala imagen ya que la congelación se percibe como una reducción de la calidad de la carne (Largerstedt *et al.*, 2008), aunque las evidencias científicas no han demostrado claramente esta percepción (Pietrasik y Janz, 2009). Por todo ello, predecir los aspectos de calidad de la carne congelada a lo largo del tiempo tiene una gran importancia desde el punto de vista tecnológico, nutricional y sensorial (Hallenstvedt *et al.*, 2012). Es muy importante para la industria cárnica el conocimiento de los cambios físicos y químicos producidos por la congelación y sus relaciones con la carne fresca (Bertram *et al.*, 2007). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar el efecto del almacenamiento en congelación durante un periodo de dos años sobre los parámetros físico-químicos y el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular en lomo de cerdo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se criaron 43 machos enteros alimentados con distintos piensos en los últimos dos meses del cebo. Estos piensos fueron isoproteicos y formulados con distintas grasas y porcentajes: control (sin grasa añadida), grasa animal (1% y 3%), aceite de soja (1%) y aceite de palma (1%, Magnapac®). La genética de los lotes fue Large White x Landrace en la línea madre y Pietráin como macho finalizador. Las canales utilizadas se encontraban en un rango de peso de 83,8±6,3 kg. Se llevó a cabo el muestreo en el músculo *Longissimus thoracis et lumborum* y se realizaron los análisis descritos posteriormente tanto en carne fresca como en carne congelada, la cual fue descongelada para los análisis y había sido almacenada durante dos años en un congelador a -20°C. Se midieron el valor de pH con un electrodo de punción, los parámetros de color CIE $L^*a^*b^*$ y las pérdidas por goteo. Se determinaron el porcentaje de grasa intramuscular (GIM) y el perfil de ácidos grasos (método de extracción Bligh y Dyer, 1959). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se obtuvieron usando una disolución de KOH en metanol y se analizaron en un cromatógrafo de gases HP-6890 II, con una columna capilar SP-2380 (100 m x 0.25 mm x 0.20 µm), usando como gas portador el nitrógeno. Los datos fueron analizados por el procedimiento GLM del paquete estadístico IBM SPSS versión 19 (2010) incluyendo en el modelo las diferentes dietas y el tiempo de congelación como efectos principales y la interacción entre ellos. Sin embargo, al no encontrarse ninguna interacción significativa entre los efectos estudiados, en esta comunicación únicamente se presentan los resultados relacionados con el efecto del tiempo de congelación. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la tabla 1, los valores de pH son mayores ($p \leq 0,001$) en la carne congelada durante dos años que en la carne fresca. Algunos autores coinciden con este incremento del valor de pH durante la congelación debido probablemente a la degradación de las proteínas de la carne por enzimas endógenas y microorganismos, que hacen que se liberen amoniaco, aminos y sulfuros orgánicos que provocan el incremento del pH (Devine *et al.*, 1995). No se encontraron diferencias entre la carne fresca y congelada para el parámetro de color L^* (luminosidad) aunque sí en los otros dos índices de color a^* (rojo) y b^* (amarillo), siendo ambos inferiores en la carne congelada.

En relación a las pérdidas por goteo durante 24 y 48 horas (tabla 1), éstas fueron sustancialmente superiores en la carne congelada. Las pérdidas de agua que se pueden producir en la carne congelada tienen diversos orígenes: alteración de las proteínas y estructura celular o sublimación de los cristales de hielo. Todo ello concluye en una menor

capacidad de retención de agua y, por lo tanto, unas mayores pérdidas de agua/peso (Jiménez y Carballo, 2000).

Tabla 1. Medias y desviación estándar (ds) de los parámetros de calidad de la carne.

	Carne fresca		Carne congelada		Sign.
	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	
pH	5,51a	0,13	5,65b	0,15	***
L^*	45,92	2,84	45,04	4,02	ns
a^*	6,48b	1,72	4,05a	1,66	***
b^*	12,55b	1,58	9,05a	1,68	***
Pérdidas por goteo 24h (%)	1,79a	0,61	5,04b	1,71	***
Pérdidas por goteo 48h (%)	2,54a	0,85	6,18b	1,95	***

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre las medias; ns = $p > 0,1$; *** = $p \leq 0,001$.

El porcentaje de grasa intramuscular y la composición en ácidos grasos de la misma se muestran en la tabla 2. El porcentaje de GIM ha tenido un aumento significativo ($p \leq 0,001$) tras la congelación, posiblemente debido a la concentración de la grasa por las pérdidas de agua que ocurren tras la descongelación. También observamos que los ácidos grasos saturados (AGS) palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) aumentan significativamente ($p \leq 0,001$) tras la congelación, dando como resultado que el sumatorio total de AGS aumente ($p \leq 0,001$). Asimismo también se encuentran resultados parecidos en el porcentaje del ácido oleico (C18:1 *n-9*) ($p \leq 0,01$) y en el total de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) ($p \leq 0,05$), aumentando su valor en ambos casos.

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de la grasa intramuscular (% de ácidos grasos totales).

	Carne fresca		Carne congelada		Sign.
	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	
GIM (%)	2,17a	0,53	3,01b	0,99	***
C16:0	22,72a	0,82	23,54b	0,87	***
C16:1	3,31	0,50	3,33	0,41	ns
C18:0	10,50a	0,81	11,19b	0,82	***
C18:1 <i>n-9</i>	39,86a	2,47	41,32b	2,24	**
C18:2 <i>n-6</i>	10,50b	2,39	9,39a	2,25	*
C18:3 <i>n-3</i>	0,40b	0,06	0,36a	0,08	***
C20:4 <i>n-6</i>	2,23b	0,70	1,58a	0,65	***
C20:5 <i>n-3</i>	0,12b	0,04	0,08a	0,03	***
C22:6 <i>n-3</i>	0,16b	0,05	0,10a	0,04	***
Σ AGS	35,17a	1,42	36,82b	1,49	***
Σ AGMI	48,90a	3,16	50,29b	2,70	*
Σ AGPI	14,78b	3,36	12,62a	3,12	***
Σ <i>n-6</i>	13,52b	3,10	11,65a	2,90	**
Σ <i>n-3</i>	1,25b	0,26	0,96a	0,23	***
AGPI/AGS ratio	0,42b	0,10	0,35a	0,09	***
<i>n-6/n-3</i> ratio	10,79a	0,53	12,15b	0,49	***

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre las medias; ns = $p > 0,1$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Por otro lado, los principales ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y su sumatorio presentaron porcentajes inferiores en la carne congelada durante dos años que en la carne fresca: el ácido linoleico (C18:2 *n-6*) ($p \leq 0,05$), el ácido α -linolénico (C18:3 *n-3*) ($p \leq 0,001$) y los ácidos grasos de cadena larga (C20:4 *n-6*; C20:5 *n-3*; C22:6 *n-3*) ($p \leq 0,001$). Una posible explicación a este hecho podría ser que los AGPI hubieran sufrido una cierta oxidación que diera lugar a otras moléculas y, por lo tanto, los niveles totales de éstos hayan disminuido. Esta alteración de los AGPI provocaría que los porcentajes totales de los AGS y

AGMI sufran un aumento relativo en la carne congelada al compararlos con los resultados de la carne fresca.

En el sumatorio total de los AGPI *n*-3 y *n*-6 se pudo observar también un descenso de los porcentajes ($p \leq 0,001$) en la carne congelada. Sin embargo, la relación *n*-6/*n*-3 tuvo valores superiores ($p \leq 0,001$) en la carne congelada que en la carne fresca. Esto probablemente sea debido a que los ácidos grasos *n*-3 son más fácilmente oxidables (López Bote *et al.*, 1997) y su descenso sería mucho mayor que el de los ácidos grasos *n*-6 haciendo así que el cociente de los valores se eleve, porque aunque ambos disminuyan siempre lo hará en mayor medida los *n*-3. El valor final del índice *n*-6/*n*-3 fue de 12,15 en la carne congelada durante dos años, el cual se aleja todavía más del valor recomendado que debería ser próximo a 4, obteniendo pues un producto menos saludable nutricionalmente tras el proceso de congelación a largo tiempo. En relación al otro índice que se estudió (AGPI/AGS), se observa un descenso significativo ($p \leq 0,001$) de 0,42 hasta 0,35 tras la congelación, disminuyendo por debajo del valor recomendado de 0,4 y, alejándose de nuevo de los valores recomendados para la salud.

En conclusión, los parámetros físico-químicos estudiados relacionados con la calidad se modifican significativamente tras la congelación durante dos años, causando un aumento de pH y de pérdidas de agua y una disminución en los índices de color (a^* , b^*) en el lomo de cerdo. El perfil de ácidos grasos también sufre variaciones durante el almacenamiento en congelación produciéndose un descenso del porcentaje de AGPI, lo que modifica el resto de porcentajes y empeora el perfil lipídico de la carne, haciéndola menos saludable para el consumo según los índices estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertram, H.C., Andersen, R.H. & Andersen, H.J. 2007. Meat Sci. 75: 128-133.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. 1959. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Devine, C.E., Graham, R.G., Lovatt, S., & Chrystall, B.B. 1995. En L. E. Jeremiah (Ed.), Freezing effects on food quality.
- Estévez, M, Ventanas, S, Heinonen, M. & Puolanne, E. 2011. J. Agric. Food Chem. 59: 5435-5443.
- Hallenstvedt, E., Øverland, M., Rehnberg, A., Kjos, N.P. & Thomassen, M. 2012. Meat Sci. 90: 244-251.
- Jiménez, F. & Carballo, J. 2000. En M. Lamúa (Ed.), Aplicación del frío a los alimentos.
- Lagerstedt, A., Enfält, L., Johansson, L. & Lundström, K. 2008. Meat Sci. 80: 457-461.
- Lopez-Bote, C.J., Rey, A.I., Sanz, M., Gray, J.I., & Buckley, D.J. 1997. J. Nutr. 127: 1176-1182.
- Pietrasik, Z. & Janz, J.A.M. 2009. Meat Sci. 81: 523-532.

QUALITY AND FATTY ACID COMPOSITION ON FROZEN PORK LOIN

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate the effect of frozen long-storage duration (two years) on pork quality and intramuscular fatty acid composition in loin. The experiment was conducted with 43 entire male pigs (Pietrain×(Landrace×Large White)) which were fed a basal diet without added fat (control diet) or supplemented with different sources of fat: animal fat (1%, 3%), soyabean oil (1%) and calcium soaps of palm oil (1%). In this study only the effect of frozen storage duration is presented. pH values and 24- and 48-h drip loss percentages were higher ($p \leq 0.001$) in 2-years frozen pork than unfrozen pork, but colour parameters (a^* and b^* values) were lower ($p \leq 0.001$) in frozen pork. The percentage of intramuscular fat and total saturated and monounsaturated fatty acids were significantly higher in 2-years frozen pork, whereas this group was the lowest values in the concentration of polyunsaturated fatty acids. The worst *n*-6/*n*-3 and PUFA/SFA ratios values was found in 2-years frozen pork. In conclusion, 2-years frozen storage modified pork characteristics and intramuscular fatty acid profile in this study.

Keywords: frozen pork, fatty acid composition, pork quality.

EVOLUCIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO DEL LOMO (m. *LONGISSIMUS DORSI*) DE CERDOS IBÉRICOS DE MONTANERA ENVASADO EN ATMOSFERA MODIFICADA

Prior, E.¹, García-Torres, S.¹, López, A.¹, Cabeza de Vaca, M.¹ y Tejerina, D.¹

¹Centro de Investigación Finca "La Orden-Valdesequera". Dpto. Prod. Animal. 06187-Guadajira (Badajoz)

Email: estrella.prior@juntaextremadura.es

INTRODUCCIÓN

La carne y productos cárnicos del cerdo Ibérico "de bellota" gozan de un gran prestigio a nivel nacional e internacional ya que son muy valorados por los consumidores y el sector de la restauración (Ventanas *et al.*, 2001), incluso para su consumo en fresco. Esto hace necesario la búsqueda de métodos de conservación que aumenten la vida útil del producto. Además, los nuevos hábitos de consumo han provocado un aumento en la demanda de productos frescos envasados, que generalmente son adquiridos en grandes superficies comerciales (Nychas *et al.*, 2008). Esto requiere un mayor control de los procesos físico-químicos y microbiológicos endógenos que afectan a la vida útil del producto y que pueden deteriorar al valor comercial, sensorial así como los atributos de calidad de los mismos. Los procesos de oxidación son una de las principales causas de alteración de la carne fresca envasada y conservada en refrigeración, ya que provoca una alteración de las características sensoriales por la generación de sustancias con olores y sabores anómalos para el consumidor final (Church *et al.*, 1995). El uso de envasado en atmosfera modificada, con alta proporción de O₂, es una alternativa muy usada para la carne fresca, ya que permite mantener el aspecto externo y el color rojo brillante de la pieza, aunque puede aumentar los procesos oxidativos durante su conservación, especialmente en carnes con una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), como la de cerdo Ibérico. Aunque también es cierto que el contenido en antioxidantes naturales de esta carne (Tejerina *et al.*, 2012) puede retrasar este proceso. Por esto, el objetivo de este trabajo es determinar el efecto del envasado en atmosfera modificada (70%O₂ + 30%CO₂) sobre el contenido en antioxidantes naturales y el estado oxidativo del músculo *Longissimus dorsi* de cerdos Ibéricos de Montanera a lo largo de su conservación en refrigeración a +4°C durante 0, 6, 12, 18 y 24 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se seleccionaron 15 cerdos IB puros, castrados, variedad *Retinta* de la Línea Valdesequera (Junta de Extremadura, Badajoz, España). Los cerdos, tras el destete, fueron alimentados con pienso comercial hasta 90±5kg, y mantenidos en la dehesa en la última fase de engorde, durante al menos 70-80 días, o hasta alcanzar una reposición mínima de 4@ (~ 46 kg). Durante esta etapa, los animales se alimentaron *ad libitum*, exclusivamente a base de los recursos naturales de la dehesa (bellotas y pastos) (Tabla 1). Los animales fueron sacrificados a peso homogéneo de 150±10kg. Tras el sacrificio, se retiró una porción del músculo *Longissimus dorsi*, desde la última vértebra lumbar a la 1ª vértebra torácica, de la media canal derecha. Se fileteó transversalmente en 5 porciones a las que se asignaron los distintos tiempos de conservación objeto de estudio: Control, 6, 12, 18 y 24 días. Las determinaciones del lote *Control* se realizaron a las 24h post-mortem y el resto fueron envasadas en atmósfera con una mezcla de gases de 70% O₂ + 30% CO₂ y almacenadas en refrigeración a 4°C para su posterior análisis. Para ello se utilizó una envasadora de barquetas ULMA® Smart-300 y bandejas de polipropileno con una permeabilidad al oxígeno de 2.2cm³/m²/24h/ at STP y que fueron cubiertas con un film de poliamida/polietileno de 70µm de espesor con una permeabilidad al oxígeno de 45cm³/m²/24h/at STP. La determinación de α y γ-tocoferol se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Liu *et al.* (1996) con modificaciones propuestas por Cayuela *et al.* (2003). El extracto fue obtenido previa saponificación y analizado por HPLC Agilent Technologies® Serie 1100 equipado con una columna Kromasil Silica 15 cm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula precedida de una precolumna Kromasil Silica (10 µm). La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de iso-octano HPLC y tetrahidrofurano HPLC (97:3 v/v), con flujo constante de 1 ml/min y con un volumen de inyección de 50 µl. La determinación se llevó a cabo por fluorescencia (Agilent Technologies®, de la Serie 1200) siendo las condiciones de trabajo del mismo λ excitación= 297 nm y λ emisión= 321 nm. Para la identificación y cuantificación de los picos se utilizó el patrón externo α-tocoferol (T3251, Sigma-Aldrich

Chemical®) y γ -tocoferol (T1782, Sigma-Aldrich Chemical®). Los valores fueron expresados como μg tocoferol/g músculo. La oxidación lipídica (TBA-RS) se midió mediante el método propuesto por Salih *et al.* (1987). El extracto fue obtenido homogenizando 2.5 g de muestra en con 7.5 ml de ácido perclórico (3.86%) y 0.25 ml de BHT. Las determinaciones se realizaron por espectrofotometría a 532nm en un espectrofotómetro Agilent Technologies® CARY 60. Para su cuantificación se utiliza como patrón el 1,1,3,3-tetraethoxypropane 97 % (TEP). Los valores se expresaron como μg de malonaldehído/g de músculo. La oxidación de las proteínas fue evaluada por medición de grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) en HCl 2N siguiendo el método descrito por Oliver *et al.* (1987). Las determinaciones fueron realizadas por espectrofotometría, usando un espectrofotómetro Agilent Technologies® CARY 60. La concentración de proteínas fue medida a 280 nm utilizando como patrón externos albúmina de suero bovino (BSA) y los carbonilos fueron medidos a 370nm. Los valores finales fueron expresados como nmol carbonilos/mg de proteína. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante el programa SPSS 15.0 (SPSS, 2005) utilizando para ello el Análisis de Varianza (ANOVA) y el test de tukey (para comparación de medias) con un modelo que tuvo como factor fijo el tiempo de maduración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se puede observar que los recursos naturales de dehesa (bellota y pastos) son una buena fuente de antioxidantes naturales (α , γ -tocoferol y fenoles totales). Esto es importante en la fase final de engorde, ya que el cerdo Ibérico es un animal monogástrico que refleja en sus tejidos la composición de la dieta ingerida (Rey *et al.*, 1997; 1998). Además se puede observar que la principal fuente de γ -tocoferol fueron las bellotas y de α -tocoferol los pastos, de acuerdo con lo afirmado por otros autores en estudios previos (Tejerina *et al.*, 2012). En la Tabla 2 se muestran los resultados a lo largo del periodo de estudio para la composición antioxidante m. *Longissimus dorsi*. Se puede observar que el contenido en α y γ -tocoferol fue inferior ($P \leq 0,001$) a partir del D6 de envasado, en una tendencia progresiva a ir disminuyendo con el tiempo de conservación, desde 2.84 hasta 0,71 $\mu\text{g/g}$ músculo, en el caso del α -tocoferol y desde 0,64 hasta 0,24 $\mu\text{g/g}$ músculo de γ -tocoferol. El estado oxidativo fue valorado a partir del índice de TBA-RS (oxidación de lípidos) y la oxidación de proteínas, mostrando ambos un incremento significativo ($p < 0,001$) a lo largo del periodo de conservación que van desde 0,02 hasta 2,17 μg MDA/g músculo en el caso del índice de TBA-RS y desde 2,35 hasta 6,76 nm carbonilos/ mg proteínas en el caso de la oxidación de proteínas, alcanzando los niveles más altos a D24 en ambos casos. Sobrepasándose a partir del D12 los 2 mg/kg que se indican como límite de aceptabilidad por el consumidor (Campo *et al.*, 2006). Esto podría indicar que el uso de atmósferas con alta proporción de O_2 pueden tener relación con los procesos de oxidación durante la conservación en refrigeración, a pesar de presentar inicialmente una buena relación antioxidantes/prooxidantes. En conclusión, se podría afirmar que la carne de lomo (m. *Longissimus dorsi*) de cerdos Ibéricos de Montanera, a pesar de su contenido en antioxidantes naturales, experimenta una tendencia a la oxidación durante su almacenamiento en refrigeración (+4°C) cuando está envasada en atmósferas ricas en O_2 .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campo, M. M., Nute, G. R., Hughes, S. I., Enser, M., Wood, J. D. y Richardson, R. I. 2006. Meat Sci. 72: 303-311.
- Cayuela, J.M., Garrido, M.D., Sancho Bañón, J. & Ros, J.M. 2003. J Agric Food Chem. 51: 1120-1124.
- Church, i.j y Parson, A.I (1995) J. Sci. Food Agric..67:143-152.
- Liu, Q., Scheller, K.K. & Schaeffer, D.M. 1996. J Anim Sci. 74: 2406-2410.
- Nychas, G.J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., Koutsoumanis, K. P. 2008. Meat Sci.. 78:77-89.
- Rey, A.I., López-Bote, C.J. & Sanz Arias, R. 1997. Anim Sci, 65: 515-520.
- Rey, A.I., Isabel, B., Cava, R. & Lopez-Bote, C.J. 1998. Can J Anim Sci, 78: 441-443.
- Salih A, M., Smith, D.M., Price, J.F., y Dawson, L.E., 1987. Poultry Sci. 66: 1483-1489.
- SPSS. PC+. 2005. SPSS Trends 14.0. SPSS Inc. Chicago. EEUU.
- Ventana, J., 1999. Cárnica 2000. Marzo. 55-50.
- Ventanas, J., Tejada, J.F. & Petró, M.J. 2001. In J. Ventanas (Ed.), Tecnología del Jamón Ibérico, 15-45.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con fondos FEDER-Gobierno de Extremadura. Los autores agradecen a la Sección de Porcino del Centro de Investigación Finca La Orden-Valdequera.

EVOLUTION OF OXIDATIVE STATUS OF *LONGISSIMUS DORSI* MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING FROM IBERIAN PIGS REARED UNDER MONTANERA SYSTEM

ABSTRACT: The Iberian pig products are most appreciated montanera within meat products manufactured in Spain, with increased consumption of fresh products, being of great importance modified atmosphere packaging in response to the demands of consumers as durability and maintenance characteristics of freshness. The aim of this work was to study the influence of modified atmosphere packaging on oxidative status of *Longissimus dorsi* from Iberian pigs Montanera during storage time (0, 6, 12, 18 and 24 days). Results showed that the antioxidant composition was lower at d6 and oxidative status was increasing during refrigerated storage time.

Keywords: Iberian pigs, antioxidant, modified atmosphere packaging, shelf life.

Tabla 1. Composición antioxidante y actividad antioxidante de la dieta ingerida.

	<i>Pienso Comercial</i> ¹	<i>Bellotas</i> ²	<i>Pasto</i> ²	Significación ³
Composición antioxidante				
α-tocoferol (mg/kg MS)	7.0c±0.91	14.5b±1.3	29.8a±2.31	***
γ-tocoferol (mg/kg MS)	Trazas	58.3a±1.29	4.1b±0.62	***
Fenoles totales (g EAG /kg MS)	1.3c±0.82	12.8a±0.67	4.69b±1.3	***
Actividad antioxidante				
AAL (g Trolox/kg MS)	0.2c±0.03	0.6a±0.07	0.5b±0.03	***
AAH (g Trolox/kg MS)	2.6c±0.24	4.9b±0.61	11.9a±0.67	***

MS, materia seca; EAG, equivalentes de ácido gálico; AAL, Actividad antioxidante lipófila; AAH, Actividad antioxidante hidrófila.

¹ Pienso de crecimiento hasta alcanzar los 90±5 kg de peso vivo.

² Composición de la dieta durante la fase final de engorde en Montanera. Valores están expresados como media±DE de tres muestreos mensuales en una durante el periodo de Montanera.

³ *** (P ≤ 0.001).

Tabla 2. Evolución del contenido en antioxidantes, actividad antioxidante y estado oxidativo (media±DE) del músculo *Longissimus dorsi* de cerdos Ibéricos de Montanera, envasado en atmósfera protectora (70%O₂ + 30%CO₂) durante 24 días a +4°C.

Parámetros	Tiempo de conservación					EEM	P ¹
	<i>Control</i>	D6	D12	D18	D24		
Composición antioxidante (μg/g músculo)							
α-tocoferol	2.84a	2.45a	1.01b	0.64b	0.71b	0.166	***
γ-tocoferol	0.64a	0.57a	0.30b	0.28b	0.24b	0.030	***
Estado oxidativo							
TBARS (μg MDA/g músculo)	0.02c	0.15bc	1.02b	2.08a	2.17a	0.178	***
nm Carbonilos/ mg proteínas	2.35c	3.18bc	3.34bc	3.98b	6.76a	0.283	***

EEM, error estándar de la media; AAL, Actividad antioxidante lipófila; AAH, Actividad antioxidante hidrófila; TBARS, especies reactivas del ácido Tiobarbitúrico; MDA, malondialdehído. ¹ *** (P ≤ 0.001). ^{a, b, c}, diferentes superíndices en una misma fila, indican que existen diferencias significativas (p≤0.05) entre los días de envasado en atmósfera para el mismo músculo.

OXIDACIÓN LIPÍDICA EN CARNE DE CORDERO LIGERO: RELACIÓN ENTRE LAS DETERMINACIONES INSTRUMENTAL Y SENSORIAL

Muela, E.¹, Sañudo, C.¹, Alonso, V.¹, Medel, I.², y Beltrán, J.A.¹

¹ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España. muela@unizar.es

² Pastores Grupo Cooperativo de Productores de Carne, Edificio Pastores, Carretera Cogullada, 65, Mercazaragoza, 50014, Zaragoza, España.

INTRODUCCIÓN

Son múltiples los factores que pueden afectar a la calidad de la carne (Sañudo *et al.*, 1998). Entre ellos, el nivel de oxidación lipídica es determinante, ya que es percibido a nivel sensorial como pardeamiento (visual) y rancidez (gusto), lo cual se traduce en la inmediata depreciación del producto. Existe una relación conocida entre la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la percepción de rancidez con panel de cata. Así, en la bibliografía se ha descrito el umbral de detección para las especies bovina (2 mg malonaldehído/kg carne; Campo *et al.*, 2006) y porcina (0,5 mg malonaldehído/kg carne; Lanari *et al.*, 1995). Sin embargo, son pocas las referencias en la especie ovina y diversas citas bibliográficas (p.ej. Camo *et al.*, 2008; Ripoll *et al.*, 2011) sólo sugieren un posible umbral.

El objetivo de este trabajo es establecer si existe relación de la oxidación lipídica entre los análisis instrumentales y sensoriales en carne de cordero ligero desde la influencia de dos factores de producción que influyen en su valor: el uso de antioxidantes en la dieta y la temperatura de conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para establecer una relación entre las determinaciones instrumentales y sensoriales de oxidación lipídica se han tomado los datos generados a partir de dos estudios.

El primer estudio (Muela *et al.*, 2009) se realizó con 60 corderos de la raza Rasa Aragonesa, divididos en 6 lotes según la dieta. Tras el destete y hasta los 3 meses de vida, se suplementó el concentrado con vitamina E (100, 200 o 300 ppm), con vitamina E y flavonoides naturales (EVENCIT®) (100+100 ppm), sólo con flavonoides (150 ppm) o no se suplementó (grupo control). Tras su sacrificio, los análisis se realizaron en el músculo *Longissimus dorsi*. La oxidación lipídica a nivel instrumental se evaluó con la técnica de Pfalgraf *et al.* (1995), expresado en mg malonaldehído (MDA) por kilogramo de carne. El test visual se realizó con jueces expertos ($n = 15$), por lo que los resultados deberán ser considerados como de carácter exploratorio. Los jueces evaluaron aceptabilidad del color (escala 1 a 8, de desagrada a agrada extremadamente) de bandejas de chuletas envasadas en atmósfera modificada y en vitrina expositora (12 h iluminación) a lo largo del tiempo (0, 4, 7 y 10 días).

El segundo estudio (Muela *et al.*, 2010) se realizó con 60 canales de la raza Rasa Aragonesa, divididas en 3 lotes por temperatura media de refrigeración en cámara (TR) evaluada (0-2 °C, 2-4 °C y 4-6 °C), de las cuales se extrajo el músculo *Longissimus dorsi* para realizar los análisis. La oxidación lipídica a nivel instrumental se evaluó con la técnica de Pfalgraf *et al.* (1995) y el análisis sensorial se realizó con nueve panelistas entrenados que evaluaron las muestras de carne basándose en un análisis cuantitativo descriptivo (escala 1 a 10, de baja a alta intensidad) y bajo condiciones controladas.

Para establecer la relación entre la variable instrumental y las sensoriales (test de cata o test visual) se calcularon las correlaciones bivariadas de Pearson y de Spearman con el programa IMB SPSS Statistics 19.0 para Windows 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de significación obtenidos de la correlación de Spearman coinciden con los expuestos para la correlación de Pearson, ratificando la distribución normal de los datos analizados. Por ello, no han sido incluidas en los resultados de este trabajo.

En el Estudio 1, además de las esperadas correlaciones significativas dentro de una misma analítica al relacionar los tiempos entre sí (datos no mostrados), se han hallado correlaciones significativas entre ambas analíticas (Tabla 1), de modo que a mayor nivel de oxidación se observó una menor aceptabilidad visual. Los valores de correlación obtenidos a 4 días fueron tuvieron el coeficiente más elevado, pudiendo servir de referencia en este caso. Para este día 4, el valor medio de oxidación lipídica fue de $0,34 \pm 0,20$ mg MDA/kg carne, la nota media de aceptabilidad fue de $5,74 \pm 1,43$ y hubo una intención de compra media del 58%, valores que podrían servir para establecer un margen de aceptabilidad con carácter exploratorio. Camo *et al.* (2008) mostraron una relación entre la percepción visual (color y decoloración), la presencia de olores extraños evaluado y el nivel de oxidación, aunque sólo relacionaron estos 2 últimos parámetros. Por otra parte, Ripoll *et al.* (2011) mostraron correlaciones significativas entre el nivel de oxidación y el color medido instrumentalmente, relacionadas negativamente, al igual que en el presente estudio.

Las correlaciones halladas en el Estudio 2 para las variables de olor y flavor figuran en la Tabla 2. Además de las esperadas correlaciones significativas entre olores, entre sabores y entre ambos (datos no mostrados), es de destacar que el valor de oxidación lipídica se correlacionó significativamente con la intensidad de olores extraños y mostró una tendencia para la intensidad de olor a cordero. Las variables estuvieron positivamente relacionadas, lo cual implica que un aumento en el índice de oxidación lipídica supuso un aumento en la intensidad del olor. Los valores medios obtenidos tras 96 h de maduración fueron de $0,134 \pm 0,01$ mg MDA/kg carne y unas intensidades de olor a cordero y a olores extraños de $4,26 \pm 0,6$ y de $1,98 \pm 1,07$, respectivamente. Dos hechos podrían justificar la baja correlación observada. En primer lugar, el que nivel de oxidación no fue suficiente para ser detectado por el panel sensorial como tal (considerando un umbral de 1 mg/kg carne; Ripoll *et al.*, 2011). En segundo lugar, el que la intensidad de olor a cordero se vea potenciada sobre otros olores en condiciones de anoxia (Reid *et al.*, 1993), el que los compuestos de la oxidación lipídica interactúen con otros compuestos volátiles (Mottram, 1998) y que el olor a rancio disminuya respecto a otros según se aumenta la cantidad de concentrado en la dieta de los corderos (Resconi *et al.*, 2009), además de la posible confusión de cierto nivel de rancidez con el olor propio a cordero o su inclusión dentro de los olores extraños.

A la vista de los resultados obtenidos, no es posible determinar una relación concreta entre las analíticas instrumental y sensorial de la oxidación lipídica y es necesaria una revisión más exhaustiva para poder hallarla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Camo, J., Beltrán, J.A. & Roncalés, P. (2008). *Meat Sci.*, 80, 1086-1091.
- Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D. & Richardson, I. (2006). *Meat Sci.*, 72, 303-311.
- Lanari, M.C., Schaefer, D.M. & Scheller, K.K. (1995). *Meat Sci.*, 41, 237-250.
- Mottram, D.S. (1998). *Food Chem.*, 62, 415-424.
- Muela, E., Sañudo, C., Campo, M.M. & Beltrán, J.A. (2009). *Actas del 60th Annual Meeting of the EAAP*. pp. 51. ISBN: 978-908-686-121-7.
- Muela, E., Sañudo, C., Campo, M.M., Medel, I. & Beltrán, J.A. (2010). *Meat Sci.* 80, 104-107.
- Pfalzgraf, A., Frigg, M. & Steinhart, H. (1995). *J. of Agric. and Food Chem.*, 43, 1339-1342.
- Reid, D.H., Young, O.A. & Braggins, T.J. (1993). *Meat Sci.*, 35, 171-182.
- Resconi, V.C., Font i Furnolls, M., Montossi, F. & Sañudo, C. (2009). *Meat Sci.*, 83, 31-37.
- Ripoll, G., Joy, M., Muñoz, F. & Albertí, P. (2011). *Meat Sci.*, 87, 88-93.
- Sañudo, C., Sanchez, A. & Alfonso, M. (1998). *Meat Sci.*, 49, 29-63.

Tabla 1. Correlaciones Estudio 1

	TBARS 0 d	TBARS 4 d	TBARS 7 d	TBARS 10 d
Aceptabilidad visual 0 d ¹	ns	ns	ns	ns
Aceptabilidad visual 4 d	ns	-0.615 (***)	-0.537 (***)	-0.519 (***)
Aceptabilidad visual 7 d	ns	-0.326 (*)	-0.360 (**)	-0.287 (*)
Aceptabilidad visual 10 d	-0.249 (t)	-0.475 (***)	-0.428 (**)	-0.378 (**)

ns: no significativo; t : tendencia ($p \leq 0.1$); * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. d: días; TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Tabla 2. Correlaciones Estudio 2

	I. olor cordero	I. olor grasa	I. olores extraños	I. flavor a cordero	I. flavor a grasa	I. flavor metálico	I. flavor ácido
TBARS	0,22 (t)	ns	0,28 (*)	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo; t : tendencia ($p \leq 0.1$); * $p \leq 0.05$; TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; I: intensidad.

LIPID OXIDATION IN LIGHT LAMB: RELATIONSHIP BETWEEN INSTRUMENTAL AND SENSORY DETERMINATIONS

ABSTRACT: There are many factors which can influence meat quality (Sañudo *et al.*, 1998). Among them, lipid oxidation is determinant, since it is perceived at a sensory level as browning (visual) and rancidity (taste), which leads to an immediate devaluation of the product. There is a known relationship between the analysis of lipid oxidation of thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS) and the rancidity perception by the panel test. Thus, there has been described in the bibliography a threshold value on bovine (2 mg malonaldehyde/kg meat; Campo *et al.*, 2006) and porcine (0.5 mg malonaldehyde/kg meat; Lanari *et al.*, 1995). However, there are scarce references to ovine and the bibliography (i.e. Camo *et al.*, 2006; Ripoll *et al.*, 2008) only suggest a tentative threshold.

The aim of this study is to establish if there is a relationship for lipid oxidation between instrumental and sensory analysis in light lamb from the influence of two production factors that influences its value: dietary antioxidant supplementation and cooling preservation temperature.

Keywords: lamb, flavonoids, cooling temperature, correlation

EFFECTO DEL TIEMPO DE CONGELACIÓN SOBRE LA TEXTURA DE LA CARNE EN CORDEROS TIPO TERNASCO

Monge P^{(*)1}., Muela, E. ¹, Olleta, J.L. ¹, Campo, M.M¹. ¹, Medel, I²., Sañudo, C¹. y Beltrán, J.A¹.

¹Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177 (50013) Zaragoza. (*)paulam@unizar.es

²Pastores Grupo Cooperativo de Productores de Carne, Edificio Pastores, Carretera Cogullada 65 Mercazaragoza, 50014 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales inconvenientes de la comercialización de la carne de cordero es el marcado anoestro estacional que presenta la especie, lo que origina una producción irregular de corderos a lo largo del año, con las consecuentes subidas y bajadas de los precios. El uso de la congelación como método de conservación permitiría estabilizar la oferta, sin picos de precios (Hansen *et al.*, 2004).

La carne puede permanecer en congelación con sus características de frescura más o menos intactas, al menos en teoría, durante largos periodos de tiempo y con pocas modificaciones respecto al producto en fresco. A pesar de ello, la congelación siempre se ha asociado con una pérdida de calidad del producto. Esto se acentúa en el caso del cordero, por ser un producto tradicional que los consumidores acostumbran a comerlo en fresco (Sañudo *et al.*, 1998). Durante años, la terneza ha sido reconocida como el factor más importante de aceptación por parte del consumidor (Bratzler, 1978) y de hecho, actualmente, la gran variabilidad de la terneza de la carne sigue siendo uno de los principales problemas para la industria cárnica (Brooks *et al.*, 2000).

Muchos de los estudios realizados sobre congelación de carne se centran en el efecto de ésta sobre su terneza. Sin embargo, siempre han existido discrepancias de opinión que podrían atribuirse a diversos factores como la variación en parámetros de congelación, a la temperatura y duración del almacenamiento y a la localización de la muestra en la canal (Shanks *et al.*, 2002). Aunque, actualmente, según la literatura científica, muchos autores parecen estar de acuerdo en que la terneza de la carne aumenta cuando se mide la fuerza máxima tras la descongelación (Shanks *et al.*, 2002; Lagerstedt *et al.*, 2008). Debido a los posibles beneficios que podría aportar el empleo de la congelación como método de conservación y a la importancia de la textura de la carne a nivel del consumidor, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una congelación prolongada sobre la textura de la carne de cordero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se sacrificaron 32 machos enteros, de raza Rasa Aragonesa con un Peso Canal Fría (PCF) de 12-14 kg. Los animales fueron distribuidos al azar en 4 lotes de congelación. Tras 24 horas en refrigeración se extrajo el músculo *Longissimus dorsi*, que fue dividido en distintas porciones para los diferentes análisis de textura. Se realizaron los análisis en fresco en las porciones correspondientes a día 0 (24 horas post sacrificio) y el resto se envasó en atmósfera protectora (O₂:CO₂:Ar) manteniéndose durante 3 y 6 días de exposición en oscuridad a temperatura de refrigeración. Las porciones a congelar se envasaron a vacío y tras un golpe de frío en un túnel en continuo (15 minutos a -36°C) se mantuvieron a -18°C durante 1, 9, 15 y 21 meses. Transcurrido este tiempo las muestras se descongelaron en agua corriente y se realizó el análisis de textura a día 0. Las porciones correspondientes a día 3 y 6 fueron envasadas en bandejas en las mismas condiciones que en la carne fresca y almacenadas en refrigeración. La textura se analizó con una máquina de ensayos Instron 4301, empleando una célula de Warner-Bratzler. Se siguió una metodología estándar. Las muestras fueron cocidas al vacío, hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C. Tras enfriarse se cortaron un mínimo de 4 paralelepípedos de 1cm² de sección, en dirección paralela a las fibras musculares (Cañeque y Sañudo, 2005). Las variables a estudiar fueron la carga máxima y la dureza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 vemos que para la variable de carga máxima, el tiempo de conservación (0, 3 ó 6 días de exposición en bandeja) tuvo un efecto significativo para todos los tiempos de congelación y no lo tuvo para el fresco. Podemos apreciar en la tabla que conforme la carne iba permaneciendo más días envasada en bandeja la fuerza necesaria para cortar la muestra iba siendo menor. Sin embargo, este efecto no fue significativo en la carne fresca. Para la variable de dureza, en el fresco y en la carne congelada 15 meses se encontró una tendencia, aunque de forma general la carne iba siendo más tierna conforme aumentaba el tiempo de envasado. Podemos observar que para un mismo tiempo de conservación en bandeja el efecto del tiempo de congelación fue significativo para las dos variables estudiadas aunque con una significación mayor en la dureza y en la carga máxima a 6 días de envasado. Como podemos observar, a día 0 (carne no envasada en bandeja), la carne con valores más altos de carga máxima y dureza se corresponden con la carne congelada. Como consecuencia del exudado que pierden los músculos tras la descongelación, estos se encuentran menos hidratados, las fibras musculares se compactan y aumenta su densidad por unidad de superficie, aumentando la fuerza necesaria para cizallar las fibras (Leygonie *et al.*, 2012b). Sin embargo, este aumento de la dureza tras la descongelación se encuentra compensado con el paso de los días envasado en atmósfera protectora, resultando la carne descongelada y tras 6 días de conservación la más tierna, por lo que parece ser que la congelación y posterior maduración favorece la tenderización de la carne. Se piensa que el mecanismo implicado es una combinación de la ruptura de las fibras musculares por acción enzimática durante la proteólisis en la maduración, y la pérdida de integridad estructural causada por la formación de los cristales de hielo. Como conclusión podría decirse que congelar la carne, incluso por largos periodos de tiempo, no perjudica a la calidad de su textura. Más bien parece ser que la favorece, siempre y cuando tras la descongelación no se consuma inmediatamente y se deje madurar un corto tiempo.

Tabla 1. Efecto del tiempo de congelación y del tiempo de conservación envasado en atmósfera protectora (0, 3 y 6 días) sobre las variables de textura: carga máxima y dureza (medias \pm desviaciones típicas)

		Tiempo Congelación					
		Fresco	1 mes	9 meses	15 meses	21 meses	Sig. ¹
Carga Máx. (kg)	0d	7.33 \pm 1.23 ^B	7.84 \pm 1.16 ^{ab}	8.34 \pm 2.13 ^{aAB}	7.77 \pm 1.35 ^{ab}	9.27 \pm 1.35 ^{aA}	*
	3d	6.99 \pm 1.57 ^{AB}	5.78 \pm 1.36 ^{bb}	6.38 \pm 2.00 ^{abB}	5.80 \pm 1.45 ^{bb}	8.02 \pm 0.94 ^{bA}	*
	6d	6.62 \pm 1.51 ^A	3.37 \pm 0.89 ^{cc}	4.55 \pm 1.70 ^{bBC}	5.21 \pm 2.07 ^{bb}	4.13 \pm 1.00 ^{cBC}	***
	Sig. ²	ns	***	***	*	***	
Dureza (kg/cm ²)	0d	2.90 \pm 0.58 ^{abB}	2.63 \pm 0.43 ^{ab}	3.15 \pm 0.93 ^{ab}	2.73 \pm 0.48 ^{ab}	3.76 \pm 0.35 ^{aA}	***
	3d	2.95 \pm 0.69 ^{ab}	2.24 \pm 0.59 ^{ac}	2.28 \pm 0.62 ^{bc}	2.22 \pm 0.57 ^{abC}	3.64 \pm 0.68 ^{aA}	***
	6d	2.59 \pm 0.65 ^{bA}	1.28 \pm 0.36 ^{bc}	1.80 \pm 0.60 ^{bBC}	2.03 \pm 0.74 ^{bb}	1.49 \pm 0.38 ^{bBC}	***
	Sig. ²	t	***	***	t	***	

Sig.: Significación; ¹ Efecto del tiempo de congelación; ² Efecto del tiempo de conservación envasado en atmósfera protectora; a, b, c: diferentes letras en la misma columna implican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tiempos de conservación; A,B,C: diferentes letras en la misma fila implican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tiempos de congelación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bratzler, L.J. (1978). Food and Nutrition Press, Westport, Connecticut, USA, pag 328-363.
- Brooks, J.C., Belew, J.B., Griffin, D.B., Gwartney, B.L., Hale, D.S., Henning, W.R., Johnson, D.D., Morgan, J.B., Parrish, F.C. Jr, Reagan, J.O., y Savell, J.W. (2000). J Anim Sci, 78: 1852-1860.
- Cañeque, V. y Sañudo, C. (2005). *Monografías INIA: Serie Ganadera*, 3, 448 pp.
- Hansen, E., Juncher, D., Henckel, P., Karlsson, A., Bertelsen, G. y Skibsted, L.H. (2004). Meat Sci., 68 :479-484.
- Lagerstedt, A., Enfält, L., Johansson, L., Lundström, K. (2008). Meat Sci, 80: 457-461.
- Leygonie, C., Britz, T.J., y Hoffman, L.C. (2012). Meat Sci., 91: 364-368. •

Sañudo,C., Nute, G. R., Campo, M. M. , María,G., Baker,A., Sierra,I., Enser, M.E., Shanks, B.C., Wulf, D.M. y Maddock, R.J. (2002). J Anim Sci, 80 (8): 2122-2125.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto CDTI 2009/0583. Los autores agradecen la colaboración de Mercazaragoza y del Grupo Cooperativo Oviaragón Pastores. Al personal de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza por el trabajo realizado.

EFFECT OF FROZEN STORAGE DURATION AND DISPLAY ON LAMB TEXTURE

ABSTRACT: The effect of several duration times of freezing (1, 9, 15 and 21 months) and three different lengths of display (0, 3 and 6 days) upon texture was evaluated in four batches of 8 carcasses of Rasa Aragonesa breed. Analyses were assessed in the muscle *Longissimus dorsi*. The measurements were taken in fresh meat, in thawed meat and at three times of display. The results showed that the storage duration had a more pronounced effect on display than did storage duration. The toughest samples were the thawed at 0 day of display but these samples were the tenderest at 6 day of display.

Keywords: freezing, display, texture, lamb.

EFFECTO DEL HIDROXITIRO SOL EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE HAMBURGUESAS DE CORDERO ENRIQUECIDAS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Apeleo, E.¹, Pérez-Santaescolástica, C.¹, Muíño, I.², Lauzurica, S.¹, Rivas-Cañedo, A.²

López, O.², Cañeque, V.², Pérez, C.³, Bermejo, R.¹, Díaz, M.T.² y De la Fuente, J.¹

¹UCM, Fac. Vet. Dpto. Prod. Animal, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid.

elicaz2007@gmail.com ²INIA, Dpto. Tec. Alimentos, Ctra. De la Coruña, km 7.5, 28040.

Madrid. ³UCM, Fac. Vet. Dpto. Fisiología (Fisiología Animal). Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha visto una creciente demanda de productos cárnicos saludables. Una de las estrategias para conseguir este objetivo es la reformulación del producto acorde con las recomendaciones nutricionales, como son los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente aquellos pertenecientes a la familia de los omega-3 (ω 3). Sin embargo, el incremento del nivel de insaturación de la grasa hace que estos productos sean más vulnerables a la oxidación, llevando a un deterioro del valor nutritivo y de la calidad organoléptica, haciéndose necesario, por lo tanto, el uso de antioxidantes para su conservación. El empleo de productos ricos en polifenólicos está teniendo un gran auge debido a su capacidad antioxidante y a que satisfacen la demanda del consumidor por alimentos libres de aditivos sintéticos. Concretamente, se ha prestado gran atención al hidroxitirosol, polifenol presente en las aceitunas, debido a su elevada capacidad antioxidante (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005) y a las propiedades beneficiosas para la salud que ello conlleva. Sin embargo, existe escasa información científica respecto a su uso en productos cárnicos.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto de aceituna rico en hidroxitirosol y de la vitamina E sobre la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cordero enriquecidas en ácidos grasos ω 3 y conservada en atmósfera modificada (MAP) con alta proporción de oxígeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de carne se obtuvieron de piernas de cordero tipo ternasco. Después de limpiar la carne de grasa subcutánea y tejido conjuntivo, ésta se troceó en dados y se pasó dos veces por una picadora con un paso de 5 mm. Se realizaron 5 lotes, todos ellos enriquecidos en ácidos grasos ω 3 mediante la adición en emulsión acuosa de un producto comercial rico en ácidos grasos ω 3 para obtener 100 mg de ácidos grasos de cadena larga/100 g de carne. Los lotes difirieron en el tipo de antioxidante y dosis usadas, añadiéndose éstos en solución acuosa durante el amasado de la carne. Tres lotes fueron adicionados con un extracto de aceituna rico en hidroxitirosol (HT) (Hyaolive®, Genosa I+D, Málaga, España) para obtener una concentración final de 50 (HT1), 100 (HT2) y 200 (HT3) mg GAE/kg de carne. Otro lote fue adicionado con α -tocoferol en concentración de 100 mg/kg de carne (VE) (DSM Nutritional Products Iberia S.A., España). El último lote, con el mismo volumen de agua destilada que el resto de lotes pero sin antioxidantes, se mantuvo como control (C). Se realizaron hamburguesas de 100 g de carne (3 hamburguesas por lote) que se conservaron en atmósfera modificada (70% O₂/30% CO₂) durante 0, 3, 6 y 9 días en refrigeración (4°C). En cada periodo de conservación, los análisis realizados fueron: determinación de la tasa de decoloración de la carne como A₅₈₀-A₆₃₀ (Van den Oord y Wesdorp, 1971) usando un espectrofotómetro CM-2600d (Minolta), determinación de la oxidación lipídica medida como TBARS (Maraschiello *et al.*, 1999), determinación de la oxidación de proteínas mediante la cuantificación de grupos carbonilos (Oliver *et al.*, 1987) y cuantificación de los ácidos grasos de cadena larga (CL) (Lee *et al.*, 2012). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA bifactorial para estudiar el efecto del lote (L), el efecto del periodo de conservación (PC) y la interacción entre ambos factores (PC*L). Cuando la interacción resultó significativa, las medias se compararon mediante el test Tukey/Kramer con un nivel de significación p<0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó una interacción entre lote y periodo de conservación (p<0,001) para la tasa de decoloración en la carne (Tabla 1). La decoloración de la carne tuvo lugar en todos los

tratamientos a lo largo de la conservación, siendo más evidente en el lote C. Los diferentes lotes de HT presentaron a día 6 de conservación el mismo grado de decoloración resultando menor que el lote C, siendo el lote VE el que presentó la menor decoloración. Al final de la conservación (día 9) todos los lotes presentaron el mismo grado de decoloración. La estabilidad del color en hamburguesas de vacuno ha sido demostrada con la incorporación de extracto de hojas de olivo (Hayes *et al.*, 2010). De igual modo, la adición de α -tocoferol permitió la estabilización del color en hamburguesas de vacuno durante su conservación (Liu *et al.*, 2010).

Para los valores de TBARS, se observó una interacción entre lote y periodo de conservación ($p < 0,001$) (Tabla 1). La oxidación lipídica aumentó a lo largo de la conservación en todos los lotes, siendo este aumento más acentuado en los lotes C y VE. Sin embargo, en los lotes suplementados con HT, este aumento fue menor, presentándose diferencias con respecto al lote C y VE a partir del día 3 de conservación. A día 9, el lote C y VE presentaron valores de TBARS mayores que los lotes suplementados con HT y, dentro de éstos, el lote HT3 resultó con el menor valor. Este efecto antioxidante del HT frente a la oxidación lipídica se ha podido observar también en salchichas enriquecidas en $\omega 3$ (Cofrades *et al.*, 2011). En hamburguesas de vacuno enriquecidas en $\omega 3$ y suplementadas con α -tocoferol (Lee *et al.*, 2005), no se observó efecto sobre la oxidación lipídica pero sí en la estabilidad del color. Siendo el HT un compuesto hidrosoluble, cabe esperar que se incorpore más fácilmente dentro del producto cárnico en comparación con la VE, que es un compuesto liposoluble.

En cuanto a la oxidación proteica, se observó una interacción entre lote y periodo de conservación ($p < 0,001$) (Tabla 1). El contenido en carbonilos aumentó en todos los lotes con el periodo de conservación, siendo este aumento menos pronunciado en los lotes con HT. Al final de la conservación, los lotes HT2 y HT3 presentaron los valores más bajos, y el lote C el más alto; sin embargo, el lote HT1 presentó un valor intermedio entre el lote C y el lote VE. La capacidad quelante de hierro del HT pudo estabilizar la oxidación proteica, siendo la presencia de metales de transición una de las causas de la oxidación de las proteínas en la carne (Estévez, 2011).

El contenido en CL estuvo afectado por el periodo de conservación ($p < 0,001$) en todos los lotes, disminuyendo a lo largo de la conservación (Tabla 1). La escasa capacidad del HT frente a la pérdida de $\omega 3$, teniendo en cuenta el alto efecto frente a la formación de TBARS, ha sido también observada en músculo de pescado (Pazos *et al.*, 2008). Sin embargo, se observó una tendencia ($p = 0,067$) del lote VE a presentar un valor mayor del contenido en CL con respecto al lote C. Al ser añadidos directamente los CL a la carne, y no estar incorporados dentro de la membrana plasmática, la adición directa de α -tocoferol pudo actuar frente a la oxidación de los ácidos grasos. Sería interesante ensayar una mezcla de HT y VE con el fin de estudiar una posible sinergia entre un compuesto hidrosoluble y otro liposoluble para obtener la mayor estabilidad oxidativa del producto cárnico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D. y Fernández-Gutiérrez, A. 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8918-8925 • Cofrades, S., Salcedo Sandoval, L., Delgado-Pando, G., López-López, O., Ruiz-Capillas, C. y Jiménez-Colmenero, F. 2011. *Food Chem.* 129: 129-136 • Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N. y Kerry, J.P. 2010. *Meat Sci.* 84: 613-620 • Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Kim, E.J. y Scollan, N.D. 2012. *Meat Sci.* 92: 863-866 • Lee, S., Decker, E.A., Faustman, C. y Mancini, R.A. 2005. *Meat Sci.* 70: 683-689 • Liu, F., Dai, R., Zhu, J. y Li, X. 2010. *J. Food Eng.* 98: 170-177 • Maraschiello, C., Sarraga, C. y García Regueiro, J.A. 1999. *J. Agr. Food Chem.* 47: 867-872 • Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S. y Stadtman, E.R. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 5488-5491 • Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I. y Medina, I. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56:3334-3340 • Van den Oord, A. y Wesdorp, J.J. 1971. *J. Food Technol.* 6: 1-13.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RTA2009-00087-C02-01 (INIA) y P2009/AGR-1704 (Comunidad de Madrid). Los autores agradecen la asignación de una beca FPI-INIA a la doctoranda Iria Muíño y al CONICITY-Chile por la concesión de la beca predoctoral a Elizabeth Apeleo.

Tabla 1. Tasa de decoloración (A_{580} - A_{630}) en %, valores de TBARS (mg MDA/kg carne), valores de oxidación proteica (nmol carbonilos/mg proteína) y contenido en ácidos grasos de cadena larga (CL) (mg/100g de carne) de hamburguesas de cordero enriquecidas en $\omega 3$ según los diferentes lotes (L): control (C), hidroxitirosol (HT) y α -tocoferol (VE) durante el periodo de conservación (PC) en MAP (70% O_2 /30% CO_2).

	PC Días	Lotes (L)					EEM ¹	Significación		
		C	HT1	HT2	HT3	VE		PC	L	PC*L
A_{580} - A_{630}	0	a52,2	a52,0	a47,7	a45,7	a56,3	3,00	***	***	***
	3	b41,0	b39,9	b40,3	b39,2	b42,4				
	6	c3,97 ^x	c15,4 ^y	c13,8 ^y	c14,9 ^y	c25,4 ^z				
TBARS	0	a0,41	a0,27	a0,27	a0,41	a0,28a	0,46	***	***	***
	3	b3,04 ^x	ab0,44 ^y	a0,38 ^y	ab0,90 ^y	b3,04 ^x				
	6	c5,57 ^x	b1,53 ^y	b1,40 ^y	ab0,61 ^y	c5,07 ^x				
Carbonilos	0	a1,75	a2,52	a1,90	a1,79	a2,23	0,39	***	***	***
	3	ab2,85	a2,15	ab2,07	ab2,44	b3,23				
	6	bc3,98 ^x	a2,63 ^y	ab3,07 ^{xy}	ab2,57 ^y	bc3,81 ^x				
CL	0	124,7	133,1	125,6	136,7	145,7	31,6	***	†	ns
	3	117,5	124,9	146,8	144,1	152,1				
	6	93,5	89,1	93,7	117,6	128,2				
	9	24,8	65,8	59,5	64,5	85,6				

¹ Error estándar de la media; *** p<0,001; †: p<0,1; ns: no significativo

^{x,y,z} Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

^{a,b,c,d} Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05)

EFFECT OF HYDROXYTYROSOL ON OXIDATIVE STABILITY OF LAMB PATTIES ENRICHED WITH OMEGA-3 FATTY ACIDS

ABSTRACT: The effect of HT on the oxidative stability of lamb patties was investigated. Ground lamb meat enriched in $\omega 3$ fatty acids were divided into five batches with different antioxidant supplements. Three batches were supplemented with 3 doses of HT being 50 (HT1), 100 (HT2) and 200 (HT3) mg GAE/kg meat, another batch was supplemented with 100 ppm of α -tocoferol (VE) and the last one without antioxidant supplementation, was kept as control (C). The lamb patties were stored under MAP (70% O_2 /30% CO_2) during 9 days. An interaction between treatment (L) and storage period (PC) was observed (p<0.001) for discoloration rate, lipid oxidation and protein oxidation. The antioxidant supplementation (HT and VE) kept meat colour stability over 6 days of storage in comparison with the batch C. In the HT batches, the TBARS values were significantly less than in the batches C and VE, and the positive effect of HT resulted as dose dependent. Treatment HT2 and HT3 showed less value for protein oxidation, treatment HT1 and C the highest values, and the treatment VE showed an intermediate value. The long-chain fatty acids content was affected by storage period (p<0.001), decreasing in all treatment.

Keywords: colour, lipid oxidation, protein oxidation, antioxidants

CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MANTAS DE CARNE SALADA Y SECA DE OVINOS Y CAPRINOS EN AMBIENTE PREINDUSTRIAL

Oliveira, A. F., Paulos, K., Rodrigues, S.**, Leite, A., Pereira, E., y Teixeira, A.*

*Centro de Ciência Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Portugal. teixeira@ipb.pt. **Centro de Investigação de Montanha. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia Apt 1172 5301-855 Bragança, Portugal

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente trabajo fue comparar la calidad microbiológica de “mantas” de carne salada y seca de ovino y caprino en dos ambientes distintos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado un total de 239 animales, 117 cabras *Serrana* y 122 ovejas *Churra Galega Bragançana* con edades entre los 5 y 9 años, sacrificadas en el matadero comercial de Bragança. El peso medio en canal fue de $20 \pm 1,9$ kg. Después de 4 días de refrigeración a 4°C se midió el pH con un electrodo de penetración de un potenciómetro portátil, calibrado, en la zona lumbar, entre la 1ª y 2ª vértebra. Las canales fueron transportadas para una industria cárnica de embutidos ubicada en Bragança, con las condiciones necesarias para tal fin y fueron escindidas en cuatro partes (dos delanteros y dos traseros). Al mismo tiempo en el Laboratorio de Calidad de la Canal y de la Carne de ESA-IPB se procedió a la fabricación de 16 mantas, con el objetivo de comparar procedimientos. Las canales fueron deshuesadas, quedando solamente las costillas, para obtener una *manta* de carne de cada canal se retiró una muestra para determinación de la actividad acuosa (a_w) inicial. Las *mantas* fueron saladas con sal (20% NaCl) durante 72 horas, a una temperatura constante de 4°C y realizándose cada 12 horas un proceso de volteo. Transcurrido el proceso de salazón, con cepillos suaves, se retiró el exceso de sal de la superficie y se tomó una muestra para determinar la a_w al final de la salazón. Posteriormente, las *mantas* fueron colgadas en una cámara de secado con temperatura alrededor de 8°C y una humedad relativa del 75% durante un período de 72 horas. Se procedió a la toma de 100 - 120 gramos del tejido muscular – *Longissimus thoracis* - en asepsia, para los análisis microbiológicos. Todo el proceso de análisis microbiológico se realizó utilizando una cámara de flujo laminar, para evitar contaminación durante la manipulación y estudio. Se pesaron tres porciones de 25g de submuestra, como está dictado por las reglas portuguesas para análisis de productos cárnicos sólidos. Estas muestras fueran maceradas en un saco estéril, con 225 mL de solución de Ringer en un *Stomacher* durante 120 segundos a una velocidad alta (230 RPM) con el objetivo de alcanzar una muestra blanda. Después de la maceración las muestras reposaran durante media hora. Al final, las disoluciones decimales hasta 10^{-4} fueron efectuadas y para los mesófilos se prepararon diluciones de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Una vez realizadas las diluciones, se procedió a la inoculación de 1 mL por incorporación en una placa de Petri debidamente esterilizada e identificada. Se repitió en las demás diluciones en orden decreciente, para el recuento de microorganismos mesófilos totales. Concluida la distribución del inóculo, se vertió aproximadamente 15 mL de medio de cultura líquido a 45°C y después se realizaron movimientos rotatorios en diferentes direcciones, 5 veces en cada dirección, con el objetivo de mezclar el inóculo con el medio de cultivo. Se dejó una placa sin inocular para el control. Con el medio de cultivo solidificado (Plate Counte Agar, PCA) se incubó en la posición invertida a 30°C/72h, como está descrito en la ISO 4833 (2003). Para el recuento de levaduras y mohos se inoculó por esparcimiento de 0,1 mL de cada dilución para el medio de cultivo Potato Dextrosa Agar (PDA). Las placas fueron incubadas a 22-25°C/48h. Tanto para las levaduras y mohos como para los mesófilos solo se seleccionaron las placas que tenían un número contable de colonias (entre 15 a 300). Para el recuento de *Clostridium* sulfito-reductores se utilizó el proceso de detección y enumeración de esporas sulfito-reductoras anaerobias de *Clostridium* según la NP-2262(1986), con modificaciones. En la identificación y contaje de coliformes y *Escherichia coli* se usó el método Simplate (AOAC 2005.03). Para la detección de la presencia de *Salmonella* spp. se utilizó el kit 1-2 Test (BIOCONTROL, método oficial AOAC 989.13), según las normas del fabricante. La búsqueda de *Staphylococcus aureus* se llevó a cabo por inoculación por esparcimiento de 0.1 mL en medio de cultivo Baird Parker (con yema de

huevo adicionada), de acuerdo con la Norma ISO 6888-1:1999. Después de incubadas (forma invertida) a 37°C/48h, las placas que tenían un número contable de colonias (entre 15 a 300) se contaron. En las colonias típicas de *Staphylococcus* (negras) se comprobó la presencia o ausencia de coagulasa a través de inoculación en plasma de conejo. El recuento de psicrófilos se llevó a cabo según la NP 2307 (1987), con una sementera de 0.1 mL de cada dilución en cultivo PCA a 7°C/10 días (forma invertida). Las placas con un número de colonias entre 15 a 300 fueron seleccionadas para realizar el conteo microbiológico. Se realizó un análisis de varianza, utilizando la versión 2011 del programa XLSTAT, un complemento para Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra las diferencias entre ovejas y cabras para las características físicas de la carne fresca, como el pH al punto isoeléctrico de las proteínas musculares (pH ultimate) y su actividad acuosa (a_w) en distintos estados de procesado. Se obtuvo un valor medio de pH de 5.74 y 5.84, estadísticamente diferentes ($p < 0,001$), para los ovinos y caprinos, respectivamente, semejantes a los valores publicados por Teixeira (2010, 2011a). También es posible observar la disminución con el paso de tiempo de los valores de la a_w , desde la muestra fresca – 0,95 para ambos, sin diferencias entre si (NS) - hasta la obtención del producto seco – 0,86 y 0,89 para caprinos y ovinos, respectivamente, con diferencias muy significativas entre las mismas ($p < 0,001$). Estos valores ayudan a controlar el desarrollo de los microorganismos en el producto seco. Lira & Shimokomaki (1998) han encontrado valores de a_w similares para productos como *Jerked beef* y Charque. En su estado salado, las diferencias han sido poco significativas ($p < 0,01$) entre especies, se obtuvieron valores de 0,92 para las cabras y 0,91 para ovejas. La evaluación de las condiciones higienico-sanitarias en el proceso industrial muestra una población de mesófilos de $3,6 \times 10^9$ y $2,5 \times 10^{10}$ ufc/g para caprinos y ovinos, respectivamente, mientras que para el modelo de laboratorio – por Oliveira, A. F. 2010- se ha obtenido una flora más baja, de $1,1 \times 10^5$ y $1,6 \times 10^4$ ufc/g para caprinos y ovinos. Los psicrófilos encontrados en las *mantas* de la industria fueron en gran cantidad ($3,3 \times 10^8$ y $3,2 \times 10^7$ ufc/g para caprinos y ovinos) cuando comparado con los datos de laboratorio ($1,7 \times 10^5$ y 1×10^5 ufc/g para caprinos y ovinos). Ubicados en muchas áreas de los humanos, los *Staphylococcus aureus* nos indican contaminación por la manipulación de los alimentos incluso en alimentos con baja actividad de agua. Los caprinos muestran conteos de $9,6 \times 10^7$ ufc/g y los ovinos con $5,8 \times 10^5$ ufc/g que cuando comparamos con el modelo de laboratorio (1×10^3 y 2×10^2 para caprinos y ovinos) son considerados muy altos. Los bajos valores de pH y a_w de estos productos favorecen la aparición de levaduras y mohos. Se muestran valores de $1,8 \times 10^7$ y $9,8 \times 10^7$ ufc/g para caprinos y ovinos, respectivamente. En el modelo de laboratorio se esperan valores más bajos, con conteos de 4×10^4 y $1,2 \times 10^4$ ufc/g para caprinos y ovinos, que son coherentes con los encontrados por Costa & Silva (2001) cuando analizaban la carne de sol. En los *Clostridium* sulfito reductores de gran importancia por la resistencia que presentaron sus esporas a altas temperaturas, se encontraron valores de 6,24 y 2,04 NMP/g para las *mantas* de caprinos y ovino, respectivamente. En el modelo de laboratorio no se contabilizaron *Clostridium*. El conteo de los coliformes totales nos muestra una mayor ocurrencia en los caprinos ($1,1 \times 10^4$ ufc/g) que en los ovinos ($5,7 \times 10^3$ ufc/g) y éstos presentan gran discrepancia cuando comparados con el proceso en laboratorio en el que no se detectaron coliformes, lo que nos evidencia una falta de higiene por parte de los trabajadores. Los indicadores de contaminación fecal muestran una mayor ocurrencia en los caprinos, con conteos de $1,5 \times 10^2$ y $8,2 \times 10$ ufc/g para los ovinos, siendo que frente al proceso de laboratorio (no se detectó), estos valores son muy altos. Para la legislación brasileña (RDC nº 12, 2001) el límite para *E. coli* se encuentra en 3×10 ufc/g, lo que muestra una débil higiene personal de los empleados de la industria. Ninguna *Salmonella* ha sido observada en el proceso de fabricación, ni tan poco en el proceso de laboratorio. La empresa en cuestión deberá atender a una mayor seguridad alimentaria de manera a garantizar alimentos saludables y libres de patógenos que van a perjudicar la salud de los consumidores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Teixeira, A., Pereira, E., & Rodrigues, S., 2011a. Libro de Actas, CALP01-P SEOC: 125-128.
 Teixeira, A., Rodrigues, M., Pereira, E. & Rodrigues, S., 2010a. Book of Abstracts, EAAP, 16: 125.
 Lira, G. M., Shimokomaki, M. 1998. Higiene Alimentar, São Paulo, 44: 66-69.
 Oliveira, A. F. 2011. Tese de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança, 54-55.

Tabla 1. Efecto de la especie en las características físicas de la carne fresca

	pH Final	Aw inicial	Aw salga	Aw secado
Caprinos	5.84±0.22	0.95±0.02	0.92±0.02	0.86±0.05
Ovinos	5.74±0.13	0.95±0.02	0.91±0.02	0.89±0.02
Sig.	***	NS	**	***

** p≤0.01; ***p≤0.001; NS- No significativo

Tabla 2. Valores del control microbiológico en proceso pre-industrial.

	Caprinos	Ovinos	Sig
Mesófilos Totales ^a	3.6x10 ⁹ ±5.6x10 ⁹	2.5x10 ¹⁰ ±7.2x10 ¹⁰	NS
Psicrófilos ^a	3.3x10 ⁸ ±3.8x10 ⁸	3.2x10 ⁷ ±4.7x10 ⁷	***
<i>S.aureus</i> ^a	9.6x10 ⁷ ±2.8x10 ⁸	5.8x10 ⁸ ±2.2x10 ⁹	NS
Levaduras y mohos ^a	1.8x10 ⁷ ±3.4x10 ⁷	9.8x10 ⁷ ±1.7x10 ⁸	*
<i>Clostridium</i> ^b	6.2±9.3	2.0±5.0	NS
Coliformes totales ^a	1.1x10 ⁴ ±2.3x10 ⁴	5.7x10 ³ ±1.5x10 ⁴	NS
<i>E.coli</i> ^a	1.5x10 ² ±3.8x10 ²	8.2x10 ¹ ±1.3x10 ³	*
<i>Salmonella spp.</i> ^a	n.d	n.d	

^a UFC/g, ^b NMP/g *p≤0.05; ***p≤0.001; NS- No significativo

CHARACTERIZATION OF THE PRODUCTION OF *MANTA*, A DRIED AND SALTED SHEEP AND GOAT PRODUCT IN PRE-INDUSTRIAL ENVIRONMENT.

ABSTRACT: Food safety it's crucial for our life and this study has the purpose to characterize some microbiologic parameters in a pre-industrial company when producing salted and cured meat Meat from sheep and goat was transformed in a semi-industrial local and traditional firm to produce a salted and dried meat product, called as *manta*. In this work was assemble the total number of mesophyll and psychrophiles bacteria (ufc/g), *Staphylococcus aureus*, yeasts and molds, sulphite reducing clostridia (NMP/g), total coliforms, *E. coli* and the presence of *Salmonella spp.* With exception to *Salmonella spp.* in all determinations the achieved scores in the production of *manta* in pre-industrial environment had more countable microorganisms than laboratorial essay. These results showed that the company must have a higher control in the hygienic conditions in all the processes, also forewarn the employees to a better person hygienic state.

Keywords: goat, sheep, meat, food safety

Article removed

This article was not presented at the Congress

Artículo eliminado

Este artículo no fue presentado a las Jornadas

Article removed

This article was not presented at the Congress

Artículo eliminado

Este artículo no fue presentado a las Jornadas

Article removed

This article was not presented at the Congress

Artículo eliminado

Este artículo no fue presentado a las Jornadas

COMPARACION DE LA REPERCUSION DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON ACEITE ESENCIAL DE CLAVO O TOMILLO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE DE OVEJA

Revilla¹, I., Sanjuán, D¹., Vivar-Quintana, A.M¹., M.A. y Palacios², C.

¹Area de Tecnología de Alimentos, Universidad de Salamanca, E.P.S. de Zamora, Av.

Requejo 33, 49022 Zamora. irevilla@usal.es.

²Area de Producción Animal. Universidad de Salamanca. Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales, Avda Filiberto Villalobos, 119, 37007 Salamanca.

INTRODUCCION

Existe un creciente interés en el campo de la nutrición animal en el estudio del efecto que puede tener la inclusión en la dieta de animales rumiantes de aditivos capaces de modificar la fermentación ruminal con el objetivo de mejorar el aprovechamiento de los nutrientes por parte de los microorganismos del rumen. En especial el uso de aceites esenciales ha suscitado gran interés debido a sus propiedades antimicrobianas y a que suponen una alternativa segura a los antibióticos (Calsmiglia *et al.*, 2006), lo cual resulta de especial interés en la producción ecológica.

De entre los aceites esenciales, los aceites de tomillo (*Thymus vulgaris*) y clavo (*Eugenia caryophyllus*) y su efecto sobre la fermentación ruminal han sido de los más estudiados. La adición de tomillo a la dieta produce una modificación de la fermentación aumentando los ácidos grasos volátiles (VFA) y disminuyendo las concentraciones de N-amoniaco (Castillejos *et al.*, 2008). En cuanto a la adición de aceite esencial de clavo, los estudios de Busquet *et al.* (2006) sobre la dinámica ruminal mostraron que éste afectó tanto al metabolismo proteico como al energético, reduciendo la concentración de AGV totales y del N amoniaco, así como aumentando la proporción molar de propionato y butirato y reduciendo la de acetato. Este perfil de fermentación indica que, a dosis óptimas, la eficacia de la utilización de la energía mejoró. A pesar de estos prometedores resultados, la información sobre el efecto de la adición de aceites esenciales sobre la composición de la leche es más bien escasa y no se ha encontrado ninguna referencia relativa al efecto de la adición de aceite esencial de tomillo y clavo. Trabajos previos en ganado vacuno, han revelado que en general la adición de diversos aceites esenciales no produjo cambios en la producción lechera o en su composición (Hosoda *et al.*, 2005, Benchaar *et al.*, 2007) si bien algunos autores han encontrado ligeros aumentos en la grasa de la leche (Yang *et al.*, 2006) o en el contenido proteico (Spanghero *et al.*, 2009), así como ligeros cambios en el perfil lipídico (Benchaar *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto el objetivo del presente trabajo fue evaluar la repercusión que tiene la inclusión de aceite esencial de tomillo y de clavo sobre la calidad de leche de ovejas de producción ecológica, comparándola frente a un grupo control y su seguimiento a lo largo de la lactación.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en un rebaño ecológico certificado (CAECYL) de ovejas de raza Churra situado en Fariza (Zamora). Debido al pequeño tamaño del rebaño los ensayos se llevaron a cabo de forma separada y consecutiva. En cada ensayo se eligieron cuarenta ovejas que parieron en un intervalo de 2 días y estas se separaron de manera aleatoria en dos grupos control y tratado. Las ovejas del grupo control iban todos los días a pastar centeno fresco (*ad libitum*) y la dieta era suplementada en el establo hasta un máximo del 30% de la ración (aproximadamente 700 gr) con pienso certificado ecológico compuesto por forraje de alfalfa (35%), guisantes (25%), centeno (17%), cebada (13%), semillas de girasol (10%) y 70 ml de Melaza Morea® (Bloques Minerales, S.L., Valladolid). En el primer ensayo los animales recibieron 5 mg por animal y día de aceite esencial de tomillo ecológico (Pranarom, Bélgica) y en el segundo ensayo 5 mg por animal y día de aceite esencial de clavo ecológico (Pranarom, Bélgica) disueltos en ambos casos en Melaza Morea® durante un total de 30 días. Las muestras de leche se tomaron a los 0, 10, 20 y 30 días tras el parto. En las muestras de leche se analizó el pH (CRISON Basic20), nitrógeno total mediante método Kjeldahl expresando los resultados como proteína (TN x 6.38), acidez total (método Dornic), extracto seco, lactosa y grasa (método Gerber). La capacidad antioxidante total fue medida mediante el método espectrofotométrico ABTS sobre leche desnatada diluida 1:10 según el método propuesto por de Renobales *et al.* (2012) usando Trolox® como

antioxidante de referencia. La curva de calibrado fue lineal y la capacidad antioxidante (TEAC) se expresó en $\mu\text{mol Trolox/ml}$. Los polifenoles totales se determinaron por el método de Folin-Ciocalteus (Paronetto, 1977) sobre suero de leche diluido 1:10. Todos los análisis se realizaron por duplicado. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis MANOVA para los factores tiempo y tratamiento. Posteriormente se utilizó el test ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre control y muestra tratada en cada uno de los puntos de muestreo (Statgraph Plus, Manugistics, Inc.1995).

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis estadístico de los valores de composición obtenidos para la leche de los grupos control en ambos ensayos, mostró diferencias estadísticamente significativas para prácticamente todos los parámetros por lo que cada tratamiento fue comparado frente a su control. Los resultados del análisis MANOVA muestran un aumento estadísticamente significativo de la cantidad de grasa ($p < 0,05$) tanto en el caso de la adición de aceite esencial de tomillo (8,2 vs 7,9) como de clavo (7,8 vs 7,5). La evolución del contenido de grasa a lo largo de la lactación (Tabla 1) sin embargo no muestra diferencias significativas entre control y grupo tratado para ninguno de los puntos de muestreo. El resto de los parámetros de composición básica, lactosa, proteína, extracto seco, pH y acidez no mostraron un efecto significativo del tratamiento cuando se les aplicó el análisis MANOVA, sin embargo sí se pudieron apreciar diferencias significativas entre control y grupo tratado en algunos puntos de muestreo. Así en el caso de la proteína, se observó un aumento significativo del grupo tratado con tomillo los días 10 y 20 de muestreo, mientras que en el caso del clavo las diferencias no fueron claras a favor de uno y otro grupo. A pesar de estos valores, el grupo tratado con tomillo no presentó unos valores de extracto seco claramente más altos mientras que en el caso del clavo el grupo tratado presentó valores significativamente más alto al principio del tratamiento pero más bajos al final. En cuanto a la lactosa no hubo ninguna influencia del tratamiento sobre este compuesto, lo cual difiere de los resultados previos de Benchaar *et al.* (2007) quienes únicamente encontraron un efecto significativo de la adición de mezcla de aceites esenciales sobre el contenido de lactosa. Sin embargo estos resultados sí coinciden con lo apuntado por Yang *et al.* (2006) y Spanghero *et al.* (2009) quienes encontraron un aumento del contenido en grasa o proteína respectivamente en la leche de animales suplementados con aceites esenciales debido a una mejora de la actividad ruminal tanto del metabolismo energético como del proteico. En cuanto al pH este fue significativamente más alto en el control que en el grupo tratado con tomillo prácticamente durante toda la lactación pero este resultado no se pudo observar en el caso del clavo y esta diferencia de pH no se vio reflejada en la acidez total, la cual no mostró diferencias significativas en ningún punto ni tratamiento.

Teniendo en cuenta que los principios activos del tomillo (timol y carvacrol) y clavo (eugenol) son fenoles, se estudió el contenido en polifenoles totales en el suero encontrándose que la suplementación con clavo produjo un efecto significativo (MANOVA $p < 0,01$) de modo que el contenido en fenoles fue mayor en el grupo tratado, siendo además las diferencias significativas hasta el día 10. Los compuestos fenólicos son potentes antioxidantes por lo que también se procedió a estudiar la capacidad antioxidante de las muestras. Aunque los valores fueron ligeramente más altos en los días iniciales de tratamiento no se encontró un efecto significativo de los aceites esenciales añadidos. Todo ello parece apuntar a un efecto más claro de los aceites esenciales en los primeros días de su uso como ya han señalado otros autores (Benchaar *et al.*, 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. & Beauchemin, K.A. 2008. *Animal Feed Sci. Tech.*, 145, 209-228.
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Chiquette, J. & Chouinard P.Y. 2007. *J. Dairy Sci.*, 90, 886-897.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel & C. 2006. *J. Dairy Sci.*, 89, 761-771.
- Calsamiglia, S., Castillejos, L. & Busquet M. 2006. *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham UK. 129-167.
- Castillejos, L., Calsamiglia S., Martín-Tereso J. & Ter Wijlen H. 2008. *Animal Feed Sci. Tech.*, 145, 259-270.
- de Renobales, M., Amores, G., Arranz, J., Virto, M., Barrón, L.J.R., Bustamante, M.A., Ruiz de Gordo, J.C., Nájera, A.I., Valdivielso, I., Abilleira, E., Beltrán de Heredia, I., Pérez-Elortondo

F.J., Ruiz, R., Albisu, M. & Mandaluniz, N. 2012. Food Chem., 130, 90–96. •Hosoda, K., Nishida, T., Park, W.Y. & Eruden B. 2005. Asian-Australian J. Animal Sci. 18, 1721-1726. •Paronetto L. 1977. Polifenoli e tecnica enologica, Selepress, Milán, Italy. Spanghero, M., Robinson, P.H., Zanfi C. & Fabbro E. 2009. Animal Feed Sci. Tech., 153, 153-157. •Yang, W.Z., Chaves, A.V., He, M.L., Benchaar C. & McAllister T.A. 2006. Can. J. Animal Sci., 86, 598.

Agradecimientos: A la Fundación Científica Caja Rural de Zamora por la financiación.

Tabla 1. Valores medios de los parámetros físico-químicos de calidad de la leche de oveja para los aceites esenciales de tomillo y clavo a lo largo de la lactación.

Día	Grasa				Día	Lactosa			
	Control	Tomillo	Control	Clavo		Control	Tomillo	Control	Clavo
0	7,95	8,10	7,40	7,60	0	4,35	4,35	4,14 ^a	4,21 ^a
10	7,50	7,80	7,15	7,30	10	4,39	4,46	4,06 ^b	3,99 ^a
20	7,80	8,10	7,40	7,65	20	4,18	4,14	4,28 ^a	4,25 ^a
30	8,35	8,75	8,25	8,70	30	4,10	4,10	4,21 ^a	4,21 ^a
Día	Proteína				Día	Extracto Seco			
	Control	Tomillo	Control	Clavo		Control	Tomillo	Control	Clavo
0	9,66 ^a	9,74 ^a	6,60 ^a	7,62 ^b	0	24,74 ^a	24,92 ^a	18,14 ^a	19,43 ^b
10	5,03 ^a	5,23 ^b	4,51 ^a	5,12 ^a	10	18,96 ^b	18,24 ^a	15,72 ^a	16,41 ^b
20	5,00 ^a	5,14 ^b	5,31 ^a	4,59 ^a	20	15,60 ^a	16,34 ^b	16,99 ^b	16,48 ^a
30	5,08 ^a	4,73 ^a	5,86 ^b	4,27 ^a	30	17,81 ^b	16,19 ^a	18,32 ^b	17,18 ^a
Día	pH				Día	Acidez			
	Control	Tomillo	Control	Clavo		Control	Tomillo	Control	Clavo
0	5,89 ^b	5,75 ^a	6,71 ^b	6,61 ^a	0	0,26	0,25	0,22	0,23
10	6,06 ^b	5,95 ^a	6,77 ^a	6,80 ^b	10	0,24	0,23	0,24	0,22
20	6,42 ^b	6,35 ^a	6,97 ^b	6,92 ^a	20	0,25	0,24	0,21	0,22
30	6,36 ^a	6,52 ^b	6,88 ^a	6,92 ^a	30	0,21	0,23	0,24	0,23
Día	Polifenoles totales (mg ac. gálico/L)				Día	TEAC (μmol Trolox/ml)			
	Control	Tomillo	Control	Clavo		Control	Tomillo	Control	Clavo
0	80,65 ^a	96,36 ^b	32,69 ^a	53,36 ^b	0	18,23 ^a	18,64 ^a	14,18	15,07
10	37,65 ^a	37,93 ^a	24,14 ^a	34,62 ^b	10	16,22 ^a	20,84 ^b	14,44	14,00
20	31,31 ^a	28,28 ^a	27,18 ^a	31,86 ^a	20	19,08 ^a	17,45 ^a	16,66	15,75
30	35,44 ^a	25,52 ^a	39,58 ^a	38,20 ^a	30	17,32 ^a	16,14 ^a	16,26	11,99

COMPARISON OF THE EFFECT OF SHEEP DIET SUPPLEMENTATION WITH CLOVE OR THYME ESSENTIAL OIL ON MILK QUALITY

ABSTRACT: The effect of thyme or clove essential oil addition to the sheep diet was evaluated. In each trial forty animals in organic production system and at the same stage of lactation was divided into two equal groups that were fed the same diet but the treated group received 5 mg of essential oil per day and animal dissolved in Melaza Morea®. Milk samples were taken on 0, 10, 20 and 30 days of treatment and analysed for fat, protein, lactose, dry extract, pH, acidity, total polyphenols and antioxidant capacity. The results showed a significant increase of fat content for both essential oils and of total polyphenols for clove essential oil. Moreover a significant increase of protein the first days of treatment was observed for thyme essential oil addition. These results point out to that essential oil addition to the ewe's diet improved the ruminal activity especially energetic and proteic metabolism.

Keywords: essential oil, dairy sheep, total phenols, TEAC.

PRIMEROS RESULTADOS SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA MICROFLORA DEL QUESO MANCHEGO A LO LARGO DE LA MADURACIÓN EN RELACIÓN CON EL TIPO DE MOLDE UTILIZADO EN SU ELABORACIÓN

Oliete, B., Jiménez, L., Pérez-Guzmán, M.D. y Arias, R.
Centro Regional de Selección y Reproducción Animal. Avda. del vino, 10. 13300.
Valdepeñas. Ciudad Real. boliete@jccm.es

INTRODUCCIÓN

El queso Manchego ocupa el primer puesto en España en la producción de quesos con Denominación de Origen (MMAMRM, 2009). Es un queso semi-duro, de coagulación enzimática cuya metodología de elaboración se describe en el pliego de condiciones de la Denominación de Origen Queso Manchego (BOE, 2011). Tradicionalmente el queso se elabora utilizando una pleita de esparto que confería al queso su aspecto característico. Actualmente se consigue el mismo efecto mediante moldes de plástico. Industrialmente se utilizan dos tipos de molde, el tradicional y el microperforado. El molde tradicional presenta escasos agujeros de drenaje por lo que requiere de la colocación de un paño de algodón para facilitar la salida de suero. El molde microperforado permite el correcto drenaje del queso sin paño lo que supone ventajas en las etapas de moldeado y limpieza. Sin embargo, las diferencias en el procedimiento de drenaje entre los dos tipos de molde pueden modificar el desarrollo de la flora bacteriana del queso a lo largo de la maduración, modificando en consecuencia sus características de calidad.

Los estudios realizados sobre la flora microbiana del queso Manchego se han centrado fundamentalmente en la caracterización de la microflora ácido-láctica (Cabezas *et al.*, 2007; Poveda *et al.*, 2004; Ballesteros *et al.*, 2006; Nieto-Arribas *et al.*, 2010). Sin embargo, son escasos los estudios realizados sobre la evolución durante el afinado de los diferentes RTA 2011-00057-C02-01 en el que estamos trabajando actualmente. Esta experiencia tiene el objetivo de estudiar la evolución de la microflora bacteriana del queso Manchego (mesófilos, bacterias lácticas, *E. coli*) a lo largo de la maduración (0, 15, 30, 45 y 60 días), en relación con el tipo de molde utilizado durante el moldeado. Se considera además la localización de la muestra en el interior o exterior del queso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los quesos se han elaborado en la planta piloto del Laboratorio de Lactología del Centro Regional de Selección y Preproducción Animal (Valdepeñas, C.Real), a partir de leche cruda de oveja de raza Manchega, el mismo día del ordeño siguiendo las indicaciones del Pliego de Condiciones de la Fundación Consejo Regulador Queso Manchego. El cultivo comercial ChoozitTM (Danisco, Copenhague, Dinamarca) se ha utilizado como cultivo iniciador. Se han utilizado dos tipos de moldes plásticos, tradicional y microperforado, de 140mm de diámetro (Perinox, Villarobledo, Albacete). Las muestras se han tomado de la parte central del queso (parte interior) y de la parte inmediatamente por debajo de la corteza (parte exterior) a los 0 días (inmediatamente después de salir de la salmuera), 15, 30, 45 y 60 días (Condiciones de maduración: 10-12°C y 75-80%HR). Se realizaron dos elaboraciones en cada una de las cuales se prepararon 10 quesos.

A partir de diluciones seriadas, se han realizado recuentos directos en placa de mesófilos totales (RMT), bacterias ácido-lácticas (BL) y *E.coli* (EC). Para el recuento de RMT se ha utilizado Plate Count Agar (PCA, Panreac, Barcelona) incubando las placas a 30°C durante 72h. En el recuento de BL se ha utilizado el medio MRS (Panreac, Barcelona) y las placas se han incubado a 30°C durante 72horas en condiciones de anaerobiosis (Anaerogen - Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra). El medio ChromID coli (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia) se ha utilizado para determinar EC, incubando a 37°C durante 24h.

Se ha realizado un análisis de varianza con el programa estadístico Statgraphics plus 5.1 considerando el efecto del tipo de molde, la localización y el tiempo de maduración. Los recuentos se han transformado en logaritmos decimales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento de microorganismos totales (RMT) se mantiene prácticamente constante a lo largo de los 60 días de maduración estudiados (Tabla 1) exceptuando una caída notable a los 30 días. Estos resultados no coinciden con la disminución a lo largo de la maduración

encontrada por Gomez *et al.* (1999) al estudiar igualmente queso Manchego. En el queso microperforado se observan notables diferencias para este parámetro entre el interior y el exterior, con valores más elevados en la zona interna, que coincidan con mayores valores de humedad y menores de pH. Los bajos valores de pH señalarían un mayor desarrollo de bacterias lácticas. Estas diferencias en RMT son especialmente importantes a los 30 días de maduración. En el queso tradicional no aparecen contrastes claros ente el interior y el exterior, aunque las mayores divergencias también se observan a los 30 días. Las diferencias de humedad y pH entre el interior y el exterior del queso tradicional son menores que en el queso microperforado.

Tabla 1. Recuentos de mesófilos totales ($\log RMT$) según el tipo de molde utilizado y de la localización de la muestra.

Días	Microperforado		Tradicional	
	Exterior	Interior	Exterior	Interior
0	7.84±0.10 ^c	8.6±0.12 ^{ef}	8.02±0.08 ^c	9.52±0.01 ^l
15	8.96±0.13 ^h	9.88±0.08 ^k	9.17±0.09 ⁱ	9.41±0.08 ^j
30	6.45±0.03 ^a	8.61±0.09 ^{ef}	7.34±0.11 ^c	6.81±0.18 ^b
45	8.73±0.12 ^{fg}	9.04±0.01 ^{hi}	8.85±0.07 ^{gh}	9.00±0.13 ^{hi}
60	8.73±0.01 ^{fg}	8.09±0.05 ^d	8.50±0.2 ^e	8.55±0.10 ^{ef}
p-valor	***			

Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$). *** $p < 0.001$

Las bacterias lácticas (BL) presentes en el queso provienen tanto de la leche como del cultivo iniciador añadido durante la elaboración. En los primeros 15 días de maduración, las BL muestran incrementos notables, coincidiendo con los resultados publicados por Gomez *et al.* (1999) y Poveda *et al.*, (2003) para lactobacilos, debido a las adecuadas condiciones para su desarrollo. A los 30 días, las BL disminuyen, para después estabilizarse a valores intermedios, coincidiendo con la evolución del RMT. Como en el caso de RMT, el queso microperforado presenta las mayores diferencias entre el interior y el exterior aunque desaparecen a partir de los 45 días de maduración. En general, el interior del queso microperforado muestra los mayores recuentos de BL durante el primer mes, lo que se podría relacionar con los menores valores de pH. En el caso del queso tradicional, al final de la maduración la parte externa muestra valores de recuento de bacterias lácticas más bajos que el resto de muestras, los cuales no se diferencian significativamente entre sí.

Tabla 2. Recuentos de bacterias lácticas ($\log BL$) según el tipo de molde utilizado y de la localización de la muestra.

Días	Microperforado		Tradicional	
	Exterior	Interior	Exterior	Interior
0	3.85±0.07 ^a	4.60±0.02 ^a	4.01±0.10 ^a	5.77±0.02 ^b
15	7.73±0.13 ^{efghi}	9.53±0.81 ^k	8.28±0.17 ^{ghij}	8.35±0.08 ^{ghij}
30	6.15±0.04 ^{bc}	8.36±0.04 ^{hij}	7.14±0.14 ^{def}	6.79±0.01 ^{cd}
45	8.50±0.04 ^{ij}	8.52±0.02 ^{ji}	7.49±1.44 ^{defg}	8.65±0.11 ^j
60	7.62±0.84 ^{defgh}	7.78±0.01 ^{efghi}	6.98±0.04 ^{cde}	7.86±0.06 ^{fg hij}
p-valor	***			

Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$). *** $p < 0.001$

El recuento de *E.coli* (EC) (Tabla 3), muestra en general valores bajos indicando la adecuada higiene en la producción y el manejo de la leche. EC disminuye de forma significativa a lo largo de la maduración. De hecho no se han detectado microorganismos mediante recuento directo en placa a tiempos superiores a 30 días de maduración. Durante los 30 primeros días el queso microperforado presenta menores recuentos que el tradicional. A partir de ese momento las diferencias se minimizan en relación con el tipo de molde y la localización.

Tabla 3. Recuentos de *Escherichia coli* (*logEC*) según el tipo de molde utilizado y de la localización de la muestra.

Días	Microperforado		Tradicional	
	Exterior	Interior	Exterior	Interior
0	4.52±0.10 ^e	5.01±0.17 ^f	5.53±0.03 ^g	5.70±0.01 ^g
15	3.86±0.19 ^d	3.44±0.08 ^c	5.20±0.01 ^e	4.21±0.08 ^d
30	3.42±0.12 ^c	2.85±0.01 ^{ab}	3.16±0.17 ^{bc}	2.72±0.34 ^a
p-valor	***			

Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$). *** $p < 0.001$

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar sobre diferentes factores que influyen en la microflora del queso Manchego, indican que el tipo de molde utilizado afecta de forma significativa durante los primeros 45 días de maduración. A partir de entonces se unifican los recuentos de la microflora estudiada. Los futuros trabajos irán encaminados a estudiar otros factores relacionados con las técnicas de elaboración que influyen en la microflora del queso Manchego, así como las diferentes características higiénico-sanitarias de las ganaderías de oveja Manchega.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A., Cabezas, L. 2006. Food Control 17:249-255.
- BOE (2011) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (17-02-2011).
- Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, L. 2007. Food Control 18:11-17.
- Gómez, M.J., Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. 1999. J Dairy Sci. 82:2300-2307.
- MMAMRM (2009) Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (POP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) de productos alimentarios p 136.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L. Cabezas, L. 2010. Food Microbiol. 27:85-93.
- Poveda, J.M., Cabezas, L., McSweeney, P.L.H. 2004. Food Chem. 84:213-218.
- Poveda, JM., Sousa, M.J., Cabezas, L., McSweeney, PL.H. 2003. Int. Dairy J. 13:169-178.

MICROFLORA VARIATION IN MANCHEGO CHEESE RIPENING IN RELATION TO THE KIND OF MOULD USE DURING CHEESEMAKING

ABSTRACT: In this work the evolution of cheese microorganisms during ripening is studied considering the kind of mould (traditional-microperforated) used during cheesemaking and the location in the cheese (internal-external). This is a starting point in the study of the microflora of Manchego cheese, one of the objectives of the current national project authors are working in. Total mesophilic counts are maintained constant with an important decrease at 30 days of ripening. Lactic bacteria show a noticeable increase during the first two weeks of ripening, after which the count is stabilized at intermediate values. In general, the microperforated cheese showed the highest differences between the internal and the external parts, with higher RMT and BL values in the internal than the external part. The initial values of *E.coli* indicate adequate management and hygienic quality of milk. Moreover, the diminution of these microorganisms during ripening is observed, especially during the first month. The differences observed in the microflora of cheese in relation to the mould used would influence the organoleptic characteristics of cheese. In future works it would be interesting to study the relationship between the changes in the cheese microbiota and the physical and sensory characteristics of cheese.

Keywords: Manchego cheese, ripening, microflora evolution

COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE OVEJA ASSAF Y MODIFICACIÓN EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DEL QUESO DE TERUEL DURANTE LA MADURACIÓN

Estrada O¹., Molino F¹., Joy M¹., Ariño A². y Juan T¹.

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Avda. Montañana, 930, 50059 Zaragoza. E-mail: olaiaestrada@yahoo.es

²Facultad de Veterinaria de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La composición en ácidos grasos totales del queso, generalmente, es similar a la de la leche de partida (Luna *et al.*, 2005), encontrándose las principales diferencias en el perfil de ácidos grasos liberados a lo largo de la maduración. La composición de la grasa láctea determina en gran medida el sabor y flavor que se va a desarrollar en el queso y factores como la raza, la alimentación y el estado de lactación de los animales afectan directamente a la proporción y posición de los diferentes ácidos grasos en los triglicéridos (Scintu y Piredda, 2007).

En la lipólisis que tiene lugar durante la maduración del queso, los triglicéridos, principales lípidos de la leche, son hidrolizados por enzimas lipolíticas (lipasas y esterasas), dando lugar a ácidos grasos libres (AGL), mono- y diglicéridos. La liberación y acumulación de AGL, tiene gran importancia en el desarrollo del flavor de los quesos.

Las enzimas lipolíticas responsables de la hidrólisis pueden provenir de diferentes fuentes como la leche, enzimas de la pasta del cuajo, enzimas microbianas procedentes de cultivos iniciadores y no iniciadores, y lipasas añadidas, en el caso que se añadan en la fabricación (McSweeney y Sousa, 2000). Los ácidos grasos de los triglicéridos pueden ser esterificados en todas las posiciones (*sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3). La posición de los ácidos grasos no es aleatoria y su posición determina de qué triglicérido se trata. Los ácidos grasos de cadena corta, como el ácido butírico (C4:0) y el ácido caproico (C6:0), predominan en la posición *sn*-1 y *sn*-3, respectivamente y en la posición *sn*-2 predominan los ácidos grasos de cadena larga, como el ácido palmítico (C16:0) (Balcão y Malcata, 1998).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios producidos en el perfil lipídico de los AGL generados en la lipólisis del Queso de Teruel, queso artesano de leche cruda de oveja Assaf elaborado con un innovador molde octolobulado, respecto a la composición en ácidos grasos totales de la leche de partida.

MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación de los ácidos grasos totales en las muestras de leche se realizó según la metodología propuesta por Luna *et al.* (2005b) basada en la transformación de los ácidos grasos en ésteres metílicos mediante la catálisis metabólica de los glicéridos con KOH, según se describe en el método de la norma UNE-EN ISO 5509:2000. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron separados en una columna capilar (HP-88 100 m x 0,25 mm x 0,20 m) de Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), utilizando un cromatógrafo de gases (CG) Hewlett-Packard 6890 HP Series GC System con inyector automático y detector de ionización de llama (FID). Se analizaron un total de 810 muestras de leche procedentes de 270 ovejas de raza Assaf.

En el queso, la extracción, separación y determinación de los AGL presentes se realizó según el método propuesto por De Jong y Badings (1990), tal y como describe Chávarri *et al.* (1997). Los AGL se separaron de los triglicéridos con un extractor en fase sólida automático Gilson GX-271 utilizando columnas de intercambio aniónico de aminopropilo (Sec-Pack Vac 3 ml (500 mg) de Waters, Waters Corporation, Milford, Massachusetts 01757). El extracto obtenido tras la purificación mediante la extracción en fase sólida se inyectó directamente, sin derivatizar, en el cromatógrafo de gases (CG-FID). Se utilizó una columna capilar de polietilenglicol entrecruzado HP-Innowax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Las muestras de queso se elaboraron en la quesería perteneciente a la misma explotación lechera bajo las condiciones establecidas en el Pliego provisional de condiciones del Queso de Teruel. Fueron analizados doce quesos con una maduración de 6 meses, procedentes de tres lotes de fabricación diferentes.

Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre medias se aplicó la prueba *t-student*, utilizando el programa estadístico *Graph Pad Prism 3.03*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ácidos grasos mayoritarios tanto en la leche como en el queso fueron el ácido palmítico (C16:0), el ácido oleico (C18:1), el ácido esteárico (C18:0), el ácido mirístico (C14:0) y el ácido cáprico (C10:0) (*Tabla 1*). Los ácidos grasos mayoritarios coinciden con los resultados presentados por otros autores para la composición en ácidos grasos de leche procedente de ovejas de raza Assaf (Luna *et al.* 2005; Toral *et al.* 2010).

El porcentaje de los ácidos grasos, butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0) y linoléico (C18:3) de la leche fue significativamente diferente a la composición en AGL del queso de Teruel ($p < 0,05$). Sin embargo, en el resto de ácidos grasos estudiados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la leche y el queso ($p > 0,05$).

La proporción de los ácidos grasos de cadena corta (C4:0 a C8:0) fue la que presentó mayores modificaciones. El ácido butírico, presente en un 2,64% en la leche, pasó a encontrarse en un porcentaje de 5,16% en el queso, en forma de AGL. El hecho de que el ácido butírico se encuentre en una concentración relativa mucho mayor al final de la maduración del Queso de Teruel se explica tanto por la selectividad de las enzimas lipolíticas presentes en el queso para hidrolizar los enlaces exteriores éster de los di- o triglicéridos (posiciones *sn-1* y *sn-3*) como por su síntesis por parte de la microbiota presente en el queso. El C4:0, al igual que otros ácidos grasos de cadena corta y media, se encuentra principalmente en la posición *sn-3* y es liberado principalmente por enzimas lipolíticas (Bills y Day, 1964; Deeth y Touch, 2000; McSweeney y Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003). Los AGL, especialmente los de cadena corta, liberados en la lipólisis, son los que contribuyen directamente al flavor de los quesos (McSweeney y Sousa, 2000; Poveda *et al.*, 2000), debido a sus bajos umbrales de percepción, mientras que los AGL de cadena larga, de más de 14 átomos de carbono, se considera que tienen menor importancia en el flavor (Molimard y Spinnler, 1996).

El perfil de los AGL en el Queso de Teruel presentó modificaciones respecto a la composición en ácidos grasos totales de la grasa láctea de la leche de partida. Este hecho pone de manifiesto la selectividad de las lipasas durante la maduración del queso por hidrolizar ciertas posiciones de los ácidos grasos en los triglicéridos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balcão, V. M., Malcata, F. X. 1998. *Biotechnol. Adv.* 16(2), 309-341. • Bills, D. D., Day, E. A. 1964. *J. Dairy Sci.* 47(7), 733-738. • Chavarri, F., Virto, M., Martín, C., Najera, A. I., Santisteban, A., Barron, L. J. R., DeRenobales, M. 1997. *J. Dairy Res.* 64(3), 445-452. • Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G. 2003. *Int. Dairy J.* 13(11), 841-866. • De Jong, C., Badings, H. 1990. *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.* 13(2), 94-98. • Deeth, H., Touch, V. 2000. *Aust. J. Dairy Technol.* 55(3), 153-168. • UNE-EN ISO 5509:2000. • Luna, P., Fontecha, J., Juárez, M., de la Fuente, M. A. 2005a. *Lipids.* 40(5), 445-454. • Luna, P., Juárez, M., de la Fuente, M. A. 2005b. *J. Dairy Sci.* 88(10), 3377-3381. • McSweeney, P. L. H., Sousa, M. J. 2000. *Lait.* 80(3), 293-324. • Molimard, P., Spinnler, H. E. 1996. *J. Dairy Sci.* 79(2), 169-184. • Poveda, J. M., Perez-Coello, M. S., Cabezas, L. 2000. *Eur. Food Res. Technol.* 210(5), 314-317. • Scintu, M. F., Piredda, G. 2007. 68(1-2), 221-231. • Toral, P.G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., De la Fuente, M.A. 2010. *J. Dairy Sci.*

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado bajo la financiación del Proyecto INIA PET200701-C07 "Mejora de la cabaña ganadera de ovino lechero y tipificación del queso con IGP Queso de Teruel". Los autores quieren agradecer la colaboración de la Asociación Turolense de Productores de Leche y Queso, al Grupo Consolidado de Investigación A01 y A49 (DGA) y al Fondo Social Europeo.

Tabla 1. Composición (%) \pm desviación estándar de los ácidos grasos de la grasa láctea y de ácidos grasos libres de muestras de Queso de Teruel.

	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
LECHE	2,64	2,49	2,62	8,04	4,50	10,24	31,15	1,08	10,45	21,85	4,26	0,68
DS	0,45	0,37	0,45	1,59	0,93	1,29	1,81	0,35	1,88	3,36	0,82	0,16
QUESO	5,16	2,22	2,29	8,13	4,66	10,65	30,67	1,92	7,41	21,08	4,56	1,25
DS	0,70	0,21	0,19	0,68	0,47	0,67	0,91	0,13	0,57	1,52	0,33	0,11
<i>p</i> -valor	***	*	*	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	***

FATTY ACID COMPOSITION OF ASSAF'S SHEEP MILK AND MODIFICATION IN THE PROFILE OF FREE FATTY ACID OF THE CHEESE FROM TERUEL (SPAIN) DURING RIPENING

ABSTRACT: We have studied the changes in the lipid profile of free fatty acids generated during Teruel cheese ripening in comparison to the composition of the total fatty acids of the starting milk. Teruel cheese is an artisanal product elaborated from raw sheep's milk with an innovative mold of eight lobes. The milk samples (n=810) were from Assaf ewes and the cheese samples (n=12) were elaborated in the same dairy farm following the production method in compliance with the provisional Product Specification for Teruel cheese. The proportion of the fatty acids butyric (C4:0), caproic (C6:0), caprylic (C8:0), palmitoleic (C16:1), stearic (C18:0) and linolenic (C18:3) of the starting milk was significantly different from the composition in free fatty acids of the Teruel cheese. However, there were no differences ($p>0.05$) between milk and cheese in the ratio of capric (C10:0), lauric (C12:0), myristic (C14:0), palmitic (C16:0), oleic (C18:1) and linoleic (C18:2) fatty acids. The proportion of short chain fatty acids (C4:0 to C8:0) showed the greatest changes, being that these fatty acids contribute most to the cheese flavor due to its low perception threshold. This fact highlights the selectivity of lipases during cheese ripening by hydrolyzing certain positions of fatty acids in triglycerides.

Keywords: Cheese ewe's milk, free fatty acid, Assaf

AUTENTICIDAD DE SALCHICHAS DE CARNE DE OVINO Y CAPRINO

Leite, A., Rodrigues¹, S., Paulos, K., Oliveira¹, A. F., Pereira, E., y Teixeira², A.
Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia Apt 1172
5301-855 Bragança, Portugal. ¹Centro de Investigação de Montanha. ²Centro de Ciência
Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Portugal. teixeira@ipb.pt

INTRODUCCIÓN

La cultura de ovinos y caprinos, en la región Transmontana, es una de las principales actividades económicas con mucha tradición en Portugal. Según Teixeira (1995), la exploración de este tipo de animales es basada en un sistema extensivo caracterizadas por zonas de montaña y de media encuesta. Gracias a este tipo de exploración, existe un aprovechamiento de terrenos abandonados con una continua utilización de los pastajes. Estos animales son muy consumidos en esta región, principalmente en algunas fechas festivas del año. A esta tradición se juntó otra, que es el consumo de embutidos, muy apreciado por los consumidores. Con estas dos tradiciones se pensó elaborar un producto único, que son las salchichas frescas de cabra y oveja. Estos dos tipos de embutidos tienen características diferentes debidas al tipo de carne que se utiliza para elaborarlos. Es un producto innovador, no solo por juntar estas dos tradiciones, pero también porque utiliza animales que los productores tienen dificultad en vender, una vez que por motivos tales como el peso y la edad, salen de las marcas de calidad. Estos factores juntos van a permitir que se elabore un producto de calidad irreprehensible, con una materia prima que inicialmente no tenía cualquier valor comercial. El objetivo específico de este trabajo es demostrar que es posible determinar la autenticidad de las salchichas de ovino y de caprino.

MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo se realizó durante siete meses en los que fueron sacrificados 280 animales. Estos animales fueron divididos en siete lotes, en que cada uno tiene 20 cabras de la raza "Serrana" y 20 ovejas de la raza "Churra Galega Bragançana". Estos animales tenían entre 5 e 7 años de edad, con un peso del canal entorno de los 20kg. Estos animales fueron sacrificados en el matadero municipal de Bragança. Después de todos los procedimientos necesarios en el matadero, los canales fueron procesados en una industria de salchichería tradicional para elaborar los embutidos frescos de carne de oveja y de cabra. Los embutidos obtenidos en esta industria tradicional fueron posteriormente analizados en el Laboratorio de Tecnología y Calidad de la canal y de la carne, en la Escuela Superior Agrária de Bragança. Las determinaciones fueron realizadas de acuerdo con las normas portuguesas. La grasa total y el perfil en ácidos gordos fue realizado a través de la NP 1613 (1979). El análisis estadístico se hizo a través de una análisis de variancias (ANOVA) con una suma de los cuadrados Tipo III siendo realizada utilizando el GLM (procedimiento general linear model) en un software SPSS, versión 17.0 (SPSS, Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se encuentran los valores medios de los ácidos grasos y de sus respectivas fracciones en las salchichas frescas de carne de cabra y oveja. En esta tabla verificamos que los ácidos grasos mayoritarios fueron: ácido oleico (C_{18:1}), ácido palmítico (C_{16:0}), ácido esteárico (C_{18:0}) y ácido linoleico (C_{18:2}). Estos ácidos grasos individuales van a influenciar sus diferentes fracciones de ácidos grasos. Podemos verificar que la mayoría de los ácidos grasos estudiados en este trabajo es diferente con el tipo de carne utilizada para elaborar estos embutidos frescos.

La figura 1 nos indica los resultados del análisis de componente principal (PCA) que fue obtenida a través del perfil de ácidos grasos y sus respectivas fracciones.

Se puede verificar que de una manera general, existe una separación de los dos tipos de embutidos frescos, lo que nos indica que su perfil en ácidos gordos es característico de acuerdo con el tipo de carne utilizada para producirlos. La primera componente principal, que contiene 63,2% de la variancia de los datos, permite que haya una separación de la mayoría de las muestras de ovino (localizadas en la región positiva de la figura) con las muestras de caprino (localizadas en la región negativa de la figura). Las muestras de ovino

son caracterizadas por una mayor cantidad de casi todos los ácidos gordos analizados y sus respectivas fracciones. La única excepción es el C_{8:0}, una vez que este ácido está en mayor cantidad en las salchichas de carne de caprino. Podemos decir que el perfil en ácidos gordos puede ser utilizado como una importante herramienta para detectar adulteraciones en este tipo de embutidos frescos, pudiendo ser utilizados como marcadores de autenticidad (Ballin et al., 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballin, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Sci.*, 86: 577-587.
- Teixeira, A. (1995). Trends in small ruminant production in extensively managed areas of North East Portugal. In: *Extensification of Beef and Sheep Production on Grassland*.

Tabla 1. Valores medios de los ácidos grasos (g/100g de producto seco)

	Ovino	Caprino	P
N	12	10	-
Grasa Total	45,11 ± 11,77 b	32,55 ± 7,71 a	***
C _{8:0}	0,22 ± 0,04 a	0,24 ± 0,05	*
C _{12:0}	0,18 ± 0,10	0,17 ± 0,05	NS
C _{14:0}	1,21 ± 0,18 b	0,93 ± 0,17 a	***
C _{16:0}	8,72 ± 2,43 b	6,28 ± 1,58 a	***
C _{16:1}	1,42 ± 0,46 b	1,14 ± 0,26 a	**
C _{18:0}	5,24 ± 1,06 b	3,59 ± 1,00 a	***
C _{18:1}	17,53 ± 5,25 b	12,26 ± 3,42 a	***
C _{18:2}	4,81 ± 1,79 b	3,77 ± 1,09 a	*
C _{18:3}	0,63 ± 0,20 b	0,53 ± 0,13 a	*
C _{20:1}	0,32 ± 0,11	0,28 ± 0,08	NS
C _{20:4}	0,18 ± 0,07	0,17 ± 0,05	NS
SFA	16,53 ± 3,51 b	11,95 ± 2,52 a	***
MUFA	20,10 ± 6,04 b	14,21 ± 3,89 a	***
PUFA	5,82 ± 2,11 b	4,46 ± 1,37 a	*
PUFA+MUFA	25,92 ± 8,04 b	18,67 ± 5,08 a	***

NS – no significativo; *P ≤ 0,05 – significativo; **P ≤ 0,001 - muy significativo; ***P ≤ 0,001 – extremadamente significativo.

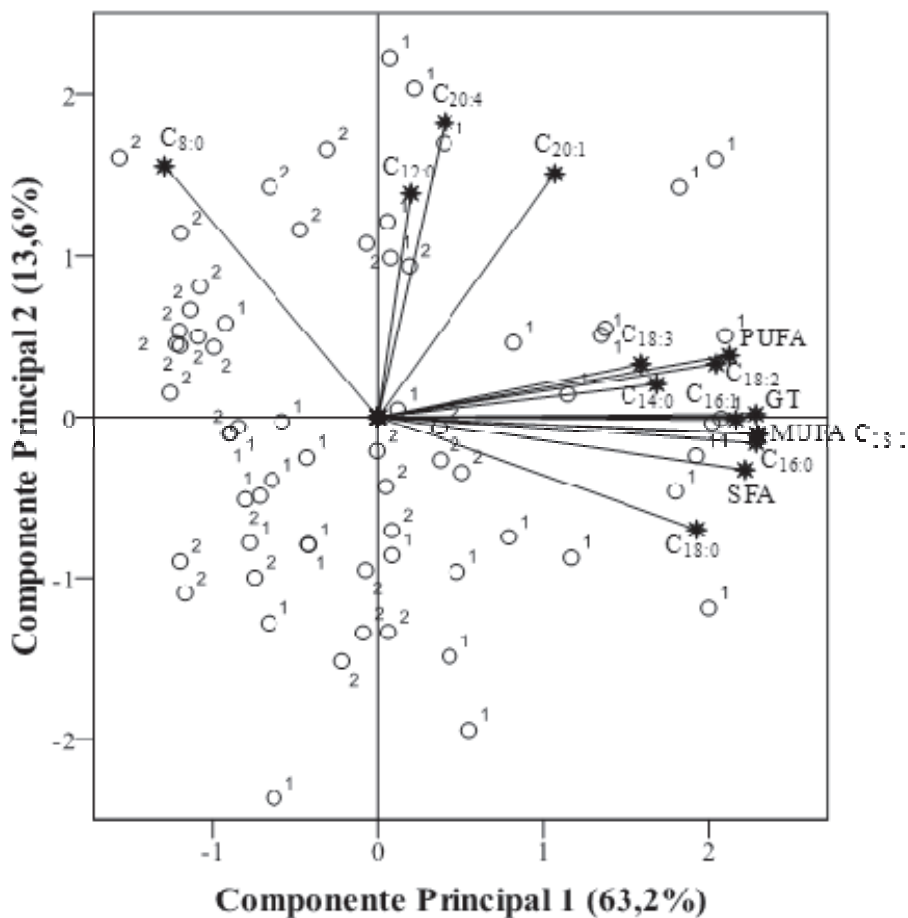


Figura 1. Resultado del análisis de componentes principales.

AUTHENTICITY SAUSAGES SHEEP AND GOAT MEAT

ABSTRACT: The aim of this work was to contribute to the fabrication of a new product, a fresh sausage based on meat from culled sheep and goat animals as a way to give added value to animals with very low marketing price. A total of 280 animals, 140 ewes and 140 goats were slaughtered, during seven months. The fabrication of sausages was carried out at a local industry and two samples of goat and sheep sausages were taken every month. Laboratory analyses of all parameters were made by triplicate. Concerning the fatty acids profile, it was checked that the main fatty acids (oleic acid (C_{18:1}), palmitic acid (C_{16:0}), stearic acid (C_{18:0}) and linolenic acid (C_{18:2})), influenced the different fractions which characterize them (monounsaturated fatty acids (MUFA), saturated fatty acids (SFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA)). Fatty acids profile could be also used as authentication tools for further monitoring and fraud detection in this kind of traditional food product.

Keywords: Cull, fresh sausages, goat, sheep

CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE SALCHICHAS FRESCAS DE OVINO Y CAPRINO

Paulos, K., Rodrigues, S., Leite, A., Oliveira, A. F., Pereira, E., y Teixeira, A.

Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia Apt 1172 5301-855 Bragança, Portugal. Centro de Ciência Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Portugal. teixeira@ipb.pt

INTRODUCCIÓN

El consumo de carne de ovino y caprino, así como la producción y el consumo de embutidos tienen una gran importancia y tradición en la región norte de Portugal. El principal objetivo de este trabajo fue combinar esta tradición con la posibilidad de crear un nuevo producto (salchichas frescas de ovino y caprino) utilizando animales de bajo valor comercial, fuera de las marcas de calidad DOP e IGP, y, así, agregar algún valor a estos animales. En este proceso de creación de nuevos productos, el análisis sensorial es una herramienta fundamental, dado que interviene en las diferentes etapas del ciclo de desarrollo, tanto en la optimización de parámetros (el color, el olor), como para entender la opinión de los consumidores. El objetivo específico de este trabajo es la caracterización sensorial de salchichas frescas de carne de ovino y caprino, por parte de un panel de catadores entrenado, y un panel de consumidores

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos se obtuvieron de un total de 280 animales divididos en 7 lotes, cada uno con 20 ovejas Churra Galega Bragançana, y 20 cabras Serranas de desvieje. Los animales fueron sacrificados en el matadero municipal de Bragança, las canales tenían un peso medio de 20 kg. La transformación se llevó a cabo en la industria *Bísaro Salsicharia tradicional*, donde se recogieron muestras aleatorias de salchicha fresca de cabra y oveja de cada lote. Posteriormente, en la Escuela Superior Agraria de Bragança, se hizo el análisis sensorial de las muestras de salchicha, por un panel de catadores con 9 elementos, debidamente seleccionados y entrenados según las normas portuguesas, y por un panel de consumidores. Las muestras se envolvieron individualmente en papel de aluminio y se cocinaron en el horno hasta que la temperatura interna alcanzase aproximadamente 75°C (NP-ISO-8586-1, 2001). Una vez asadas, las salchichas frescas se dividieron en pedazos de 0,5 cm de grosor, se envolvieron en papel de aluminio, marcado con códigos aleatorios de 2 dígitos y una letra y se colocaron en un horno precalentado a 60-70°C para posterior evaluación. Los catadores evaluaron cada muestra para la intensidad de olor, presencia de olor extraño, intensidad de *flavour*, presencia de *flavour* extraño, dureza, jugosidad, fibrosidad, intensidad de picante, intensidad de sabor dulce y aceptabilidad general. El panel de consumidores evaluó cada muestra para sabor, sabor picante, textura y evaluación general. En cada sesión, evaluaron muestras correspondientes a 4 tratamientos, relativas a la especie y el uso o no de pimentón. Las muestras se presentaron al azar en cada período de sesiones. Se utilizó el Análisis Procrusteano Generalizado (APG) para reducir al mínimo las diferencias entre los catadores. Además, se llevó a cabo una caracterización de los productos. Para estudiar las preferencias de los consumidores se hicieron Mapas de Preferencia. Todo el análisis estadístico se realizó basado en el software XLSTAT complementario a Microsoft Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los catadores produjeron un perfil de 10 términos utilizados para describir las diferencias entre los productos. Como se trata de un panel de catadores, las evaluaciones fueron similares. De hecho, el análisis de cada catador muestra bajos niveles de variación, lo que confirma la fiabilidad del panel. Sin embargo, ningún entrenamiento elimina completamente la variación entre catadores (Stone y Sidel (2004)). Algunos catadores tienden a usar una escala mayor, mientras que otros utilizan sólo una parte más estrecha de la escala, como el catador 7 que tiende a usar la escala más ampliamente que los demás. Las salchichas más consensuales entre los catadores fueron las de ovino con pimentón (Oc), ya que tuvieron un menor residuo. Para minimizar las diferencias entre los catadores del panel, se utilizó una APG para encontrar un consenso (Figura 1). Los dos primeros ejes de la configuración de consenso explican 86,7% de la variación total entre muestras, un valor mucho mayor, el 68,2%, al registrado por Rodrigues *et. al.* (2009) en borrego Terrincho, pero inferior al 93%

registrado por Rodrigues y Teixeira (2009) en cabritos Serranos. La correlación entre los parámetros sensoriales y factores (Figura 1) indica que las salchichas frescas de las diferentes especies se distinguen por la dureza y fibrosidad, parámetros positivamente correlacionados entre sí, y la succulencia. Las salchichas frescas de ovino fueran consideradas más succulentas, mientras que las de caprino fueron consideradas más duras y fibrosas. Las salchichas con o sin pimentón se distinguen por la presencia e intensidad de *flavour*, intensidad de picante, presencia de olor extraño, parámetros positivamente correlacionados entre sí, en aceptabilidad, intensidad de olor y la intensidad de sabor dulce. Las salchichas con pimentón fueron evaluadas como las que tienen una mayor intensidad de olor y de sabor dulce, y mayor aceptabilidad que las salchichas sin pimentón. Se puede apreciar una gradación de las salchichas de animales de especies diferentes en el factor 1, a la izquierda aparecen las ovejas (Oc y Os) y a derecha las cabras (Cc y Cc). También puede observarse en el factor 2 que hay una separación entre las que tienen pimentón (la parte superior del eje) y las que no lo tienen (por debajo). Este hecho indica que los catadores fueron capaces de distinguir perfectamente entre salchichas frescas de animales de las dos especies y diferentes formulaciones. Sobre la caracterización de los productos, el atributo que tiene mayor poder discriminatorio es la intensidad de picante ($P \leq 0,001$). Las salchichas de ovino sin pimentón son consideradas más picantes, mientras que las de ovino y de caprino con pimentón son menos picantes (Tabla 1). En lo que se refiere a los mapas de preferencia de los consumidores, sólo es significativo para el sabor picante, donde se observó una preferencia por las salchichas de caprino sin pimentón, caracterizadas por tener un sabor picante menos intenso (Figura 3). En los mapas de preferencia para el sabor (Figura 2), textura (Figura 4) y evaluación general (Figura 5) no fueron detectadas diferencias en las preferencias por parte de los consumidores, lo que significa que hay espacio para todos los tipos de salchichas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NP-ISO-8586-1. (2001). Norma Portuguesa ISO 8586-1.
- Rodrigues, S. e Teixeira, A. (2009). Effect of sex and carcass weight on sensory quality of goat meat of Cabrito Transmontano. *Journal of Animal Science*, 87:711-715
- Rodrigues, S., Pereira, E., Silva, S., Santos, V., Azevedo, J. e Teixeira, A., 2009 Avaliação da qualidade sensorial de carne de Borrego Terrincho. Efeito do sexo e do peso da carcaça. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Stone, H., Sidel, J. L., 2004. Sensory Evaluation Practices, Third Edition Elsevier Academic Press, California, USA.

SENSORY CHARACTERIZATION OF FRESH SAUSAGES OF SHEEP AND GOAT MEAT

ABSTRACT: The main objective of this work was the sensory characterization of fresh sausages from 140 culled Serrana goats and 140 culled Churra Galega Bragançana ewes, to improve the added value of this animals. Species and type of preparation effects were studied. Odour intensity, presence of strange odour, flavour intensity, presence of strange flavour, toughness, juiciness, stringiness, spicy intensity, sweet intensity and overall acceptability were evaluated by a taste panel. Taste, spicy taste, texture and overall appreciation were evaluated by a consumers' panel. Taste panel data were analysed by a Generalised Procrustes Analysis and a characterization of the product. Consumers' panel data were analysed by Preference Maps. The first 2 factors explained 86,7% of total variation. Different sausages samples were perfectly differentiated by assessors. Goats sausages have been considered more tough and fibrous and the sheep's most succulent. The panelists felt that sheep sausages without paprika had greater intensity of flavour, taste spicy, and strange smell, while sheep sausages with paprika were the most well accepted by the tasters. As to consumers, there is no preference for any type of sausage, meaning that all types of sausages have market opportunity.

Keywords: sheep, goats, fresh sausages, sensory analysis

Tabla 1. Coeficientes de los modelos

	Fibros.	P. Flavour Estr.	Int. flavour	P. Olor Estr.	Sucul.	Int. Picante	Int. sabor dulce	Acept.	Int. odor	Dure
Os	3,661	3,124	5,117	2,247	6,072	4,879	3,433	5,502	3,540	2,657
Cs	4,458	2,709	4,884	2,204	4,564	4,037	3,570	5,177	3,528	4,027
Oc	3,609	2,602	4,351	2,197	5,713	3,072	4,125	5,946	3,667	2,629
Cc	4,639	2,367	4,089	2,118	4,815	2,715	4,583	5,586	3,514	3,366

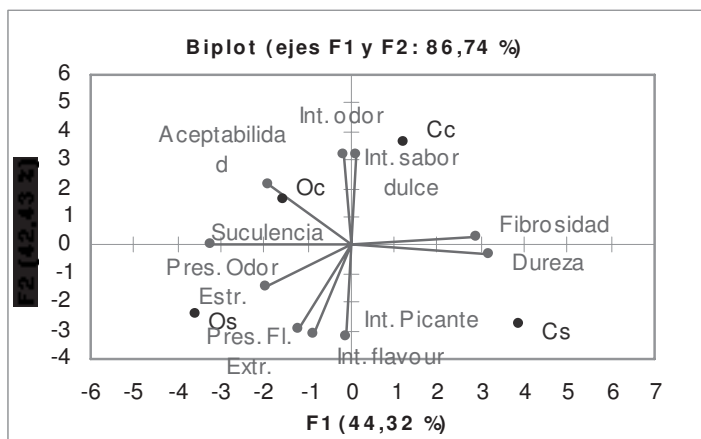


Figura 1. Configuración de consenso.

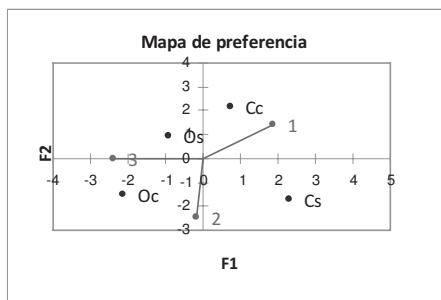


Figura 2. Mapa de Preferencia – sabor

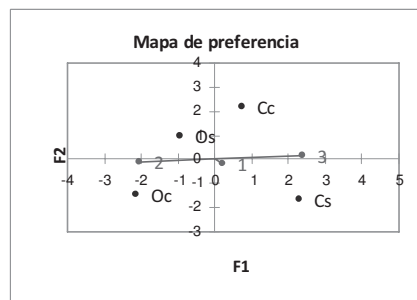


Figura 3. Mapa de Preferencia – sabor picante

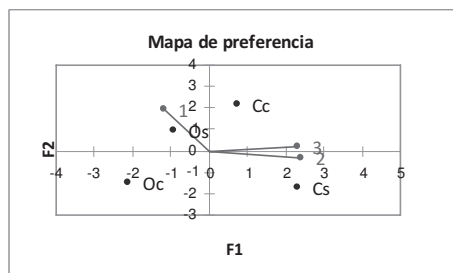


Figura 4. Mapa de Preferencia – Textura

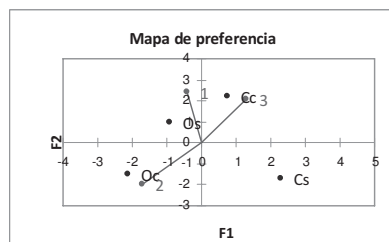


Figura 5. Mapa de Preferencia – evaluación general

CHISTORRA DE NAVARRA: PERFIL SENSORIAL Y COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Beriaín¹, M.J., Indurain¹, G., Amatria¹, L., Gómez¹, I., Sarriés¹, V. e Insausti¹, K.
¹ ETSIA. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona.
E-mail: mjberiaín@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

La chistorra es un embutido crudo curado originario de Navarra elaborado tradicionalmente a partir de la matanza del cerdo. El tamaño de picado es de 6mm, se mezcla con el adobo compuesto de pimentón y ajo y se embute posteriormente en una tripa delgada de cordero o artificial. Se diferencia de las longanizas por su menor diámetro, por el porcentaje cárnico de su formulación y por su escaso tiempo de curación que le hace un producto más perecedero. Desde hace varios años se celebra el concurso de la chistorra de Navarra organizado por el Gremio de Carniceros de Navarra con el fin de promocionar este producto y potenciar una marca de calidad. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la calidad organoléptica de la chistorra de Navarra y su relación con la composición físico-química y el perfil de ácidos grasos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se evaluaron 51 chistorras de diferentes fabricantes. El análisis sensorial se realizó mediante un panel de 15 profesionales (carniceros, técnicos de la industria y del mundo académico, gastrónomos y periodistas). El proceso de evaluación y selección de las muestras de chistorra se realizó en tres fases. En la primera de ellas se evaluó visualmente el aspecto en crudo del producto (presencia de tripa natural, atado artesano, uniformidad en el llenado, ausencia de manchas, color y textura; escala de 0 a 20 puntos) y se eliminaron 11 de las 51 chistorras evaluadas. En la segunda fase se evaluó el producto cocinado (textura, aroma, sabor residual, ausencia de ternillas y color; escala de 1 a 10 puntos). Las chistorras finalistas con las 10 mejores notas finales (suma de las puntuaciones de las dos primeras fases) fueron evaluadas en la tercera fase, empleándose la misma metodología, atributos y escala que los utilizados en la segunda. Se recogieron muestras representativas de las 10 chistorras finalistas, para los análisis de la composición química, la textura y el perfil lipídico. Los parámetros químicos analizados fueron: humedad (ISO 1442-1973), proteína (ISO 937-1978), grasa (ISO 1443-1973), hidroxiprolina (Bergman y Loxley (1963) modificado por Bonnet y Kopp (1986)). El análisis de textura se realizó según el método de Beltrán y Roncalés (2005) adaptado a este producto (muestras crudas de 3 cm de longitud y 2 cm de diámetro), usando un texturómetro TA-XT2i de Stable Micro Systems equipado con una cizalla Warner-Bratzler. El método utilizado para la extracción y metilación de la grasa fue el descrito por Whittington *et al.* (1986), al que se le aplican las modificaciones de Aldai *et al.* (2005). El perfil de ácidos grasos se analizó mediante cromatografía de gases con el equipo GC 7890. Los ácidos grasos fueron expresados como porcentaje (%) del total de ácidos grasos detectados. El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 19.0, calculando los descriptivos (media, desviación estándar, coeficiente de variación, máximo y mínimo) para cada variable e identificando las diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$) con el test de Tukey. Además, se calcularon las correlaciones entre variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra los valores de los atributos sensoriales de las chistorras. Se puede observar que las chistorras finalistas presentaron una nota más alta en el color visual del producto crudo ($p < 0,05$), una mejor textura, aroma, sabor y color ($p < 0,001$) y una menor presencia de ternillas ($p < 0,001$), al compararlas con el grupo de las chistorras no finalistas. En la figura 1 aparecen los resultados de los atributos sensoriales de las 10 chistorras finalistas. La chistorra 223 fue la que presentó mejores puntuaciones en todos los parámetros evaluados. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos en la resistencia al corte con la cizalla Warner-Bratzler, siendo la chistorra ganadora 223, seguida por la 523, las que mostraron una mayor resistencia al corte. En la tabla 2 se muestra la composición química de las 10 chistorras finalistas. Lo que caracteriza a las tres chistorras que obtuvieron mayor puntuación (223, 523 y 428) fue una elevada relación grasa/hidroxiprolina

(237,50, 200,59 y 209,72, respectivamente). La única relación estadística significativa entre la composición físico-química y los resultados del análisis sensorial fue la existente entre el contenido de hidroxiprolina y la nota de ausencia de ternillas ($r=-0,643^*$, $p<0,05$). Respecto al perfil de ácidos grasos en las muestras de chistorra, la composición varía dentro de los siguientes márgenes: ácidos grasos saturados (AGS), 38–45%; ácidos grasos monoinsaturados (AGM), 42–49%; ácidos grasos poliinsaturados (AGP), 9,5–18% (tabla 3). Hay escasez de trabajos y estudios sobre la chistorra, pero el contenido en grasa y el perfil lipídico encontrado está dentro del rango de valores observados para embutidos crudos curados (Valencia *et al.* 2007; Beriain *et al.*, 2011). Cabe destacar la relación AGP/AGS obtenida (0,32), que es próxima a la recomendada nutricionalmente (0,40; Department of Health, 1994).

En conclusión, la calidad de la chistorra viene definida por un elevado valor la resistencia inicial y firmeza en el primer mordisco cuando la chistorra se introduce en la boca, un contenido en grasa de al menos 67% de porcino (% en materia seca), un bajo valor de hidroxiprolina y una relación AGP/AGS próxima a la recomendada nutricionalmente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldai, N., Murray, B.E., Nájera, A.I., Troy, D.J. & Osoro, K. 2005. *J.Sci.Food.Agr.* 85: 1073-1083.
- Beltrán, J. A. & Roncalés, P. 2005. Monografías INIA: Serie ganadera. Nº3: 237-242.
- Bergman, I. & Loxley, R. 1963. *Anal. Chem.* 35: 1961-1965.
- Beriain, M.J., Gómez, I., Petri, Insausti, K. & Sarriés M.V. 2011. *Meat Sci.* 88(1): 189-197.
- Bonnet, M. & Kopp, J. 1986. *Cahiers Tech l'INRA*, 5: 19-30.
- Department of Health. 1994. Report on Health and Social Subjects Nº46. London: H.M. Stationery Office.
- Hadorn, R., Eberhard, P., Guggisberg, D., Piccinalli, P. & Schlichtherle-Cerny, H. 2008. *Meat Sci.* 80(3): 765-770.
- Hill F. (1966). *J. Food Sci.*, 31: 161.
- ISO 937. 1978. International Standards: Meat and Meat Products.
- ISO 1443. 1973. International Standards: Meat and Meat Products.
- ISO 1442. 1973. International Standards: Meat and Meat Products.
- Valencia, I., Ansorena, D. & Astiasarán, I. 2007. *Food Chem.* 104: 1087–1096.
- Whittington, F.M., Prescott, N.J., Wood, J.D. & Enser, M. 1986. *J. Sci. Food Agr.* 37(8): 753-761.

Agradecimientos: Proyecto financiado por Gremio Carniceros Charcuteros de Navarra.

Tabla 1. Atributos sensoriales de las chistorras finalistas frente a las no finalistas.

	No finalista (n=30)		Finalista (n=10)		Sig
	media	±ES	media	±ES	
Nota visual crudo	14,57	±0,25	15,83	±0,43	*
Cocinado					
Textura	6,04	±0,13	8,00	±0,23	***
Sabor y aroma	5,72	±0,14	7,46	±0,25	***
Sabor residual	5,54	±0,14	7,20	±0,24	***
Ausencia ternillas	6,53	±0,14	8,00	±0,25	***
Color	6,44	±0,14	8,10	±0,24	***
Total cocinado	30,28	±0,56	38,76	±0,96	***

ES: error estándar

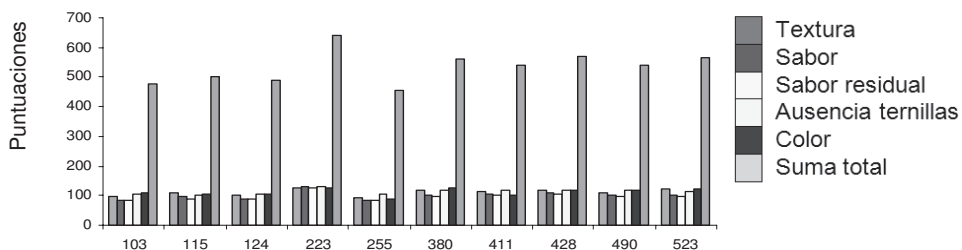


Figura 1. Atributos sensoriales de las 10 chistorras finalistas.

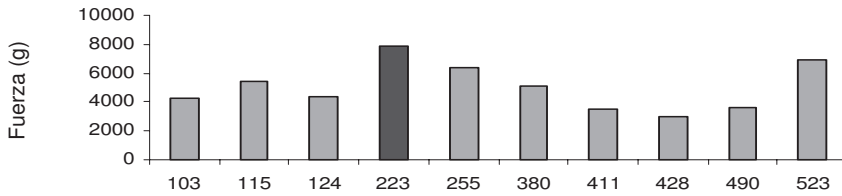


Figura 2. Resistencia al corte con cizalla Warner-Braztler de las 10 chistorras finalistas.

Tabla 2. Composición química (% en materia seca) de las 10 chistorras finalistas.

Chistorra	Humedad	Proteína	Grasa	Hidroxi prolina	grasa/hidroxi prolina
103	50,20	37,60	56,30	0,30	187,67
115	45,00	24,00	70,70	0,57	124,04
124	33,90	19,64	73,40	0,55	133,45
223	45,40	28,10	66,50	0,28	237,50
255	55,40	33,30	61,00	0,42	145,24
380	44,80	30,20	63,20	0,41	154,15
411	47,40	27,40	67,10	0,37	181,35
428	36,00	18,20	75,50	0,36	209,72
490	44,20	24,20	70,70	0,42	168,33
523	46,90	26,80	68,20	0,34	200,59
Media	44,92	26,94	67,26	0,40	174,20
ES	5,91	5,59	5,54	0,09	34,13
CV	13,16	20,73	8,23	22,63	19,59

ES: error estándar; CV: coeficiente de variación

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (%) de las 10 chistorras finalistas.

	media	ES	CV	máximo	mínimo
AGS	41,80	2,26	5,40	44,55	38,12
AGM	44,91	2,06	4,58	48,75	41,87
AGP	13,12	2,63	20,04	17,67	9,41
AGP/AGS	0,32	0,08	24,04	0,45	0,21

ES: error estándar; CV: coeficiente de variación

CHISTORRA OF NAVARRA: SENSORY PROFILE AND PHYSICAL-CHEMICAL COMPOSITION

ABSTRACT: The aim of this research was to study the organoleptic quality of the chistorra and its relationship with the physical-chemical composition and fatty acid profile. Sensory quality of 51 chistorras was assessed during 3 sessions by a professional panel (n=15). In the first session, visual aspect and odour parameters were determined in raw product; whereas in the second session texture and flavour parameters were determined in cooked product. The 10 best chistorras from the first and second session were evaluated in the third one. Analyses of texture and chemical composition and profile of fatty acids were performed on the 10 finalists chistorras. The most highly sensory valued chistorras had a higher tenderness, flavor and a fat/hydroxyproline ratio. The fatty acid profile (42% SFA, 45% MUFA and 13% PUFA) was similar to those found in raw-cured sausages. The quality of the chistorra is defined by a high resistance value in the initial bite, a fat content of at least 67% of backfat (% dry matter), a low hydroxyproline content and a PUFA/SFA ratio that is close to the recommended one.

Keywords: chistorra, sensory characteristics, chemical composition

Article removed

This article was not presented at the Congress

Artículo eliminado

Este artículo no fue presentado a las Jornadas

Article removed

This article was not presented at the Congress

Artículo eliminado

Este artículo no fue presentado a las Jornadas

Article removed

This article was not presented at the Congress

Artículo eliminado

Este artículo no fue presentado a las Jornadas

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE TERNEROS JÓVENES DE RAZA TUDANCA

Serrano, E., Humada, M.J. y Cimadevilla, C.

Consejería de Ganadería, Pesca y Desarrollo Rural. Gobierno de Cantabria.

emmaserrano@cifacantabria.org

INTRODUCCIÓN

Aunque la raza Tudanca se encuentra incluida en la I.G.P. "Carne de Cantabria", la mayoría de los terneros se venden como pasteros con 5-6 meses de edad y son acabados fuera de su zona de producción. Dentro de los tipos de animales comercializados tradicionalmente destaca un tipo de ternero joven, sacrificado con 9-10 meses de edad y que habitualmente se mantenía mamando hasta el momento del sacrificio. En la actualidad es frecuente que esos terneros se desteten y se alimenten con un forraje conservado y concentrado a libre disposición. La obtención de información sobre la producción de este tipo de animales puede ser interesante para fomentar el acabado de terneros en las explotaciones teniendo en cuenta que se trata de un ciclo productivo corto en el que se acaban animales nacidos en invierno que se sacrifican en el otoño siguiente. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de dos sistemas de producción (acabado intensivo vs. amamantamiento y acabado en pastoreo) sobre los parámetros productivos, la calidad de la canal y de la carne de terneros tudancos sacrificados entre los 9 y los 10 meses de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

La fase de producción de los terneros se desarrolló en la finca Aranda del Gobierno de Cantabria (Alfoz de Lloredo, 84 m sobre el nivel del mar). Se siguieron dos estrategias de producción: -acabado en pastoreo, suplementación desde los 6 meses de edad con harina de cebada administrada en tolva a libre disposición, amamantamiento hasta el sacrificio a los 10 meses de edad (lote TP, n=8); -acabado en cebadero, destete a los 5 meses, alimentación con silo de hierba y un concentrado comercial a libre disposición, sacrificio a los 9 meses de edad (lote TC, n=8).

Los terneros del lote TP nacieron en la 1ª parte de la paridera de invierno. El pastoreo se realizó de forma rotacional en tres parcelas con pasto natural de 1,94; 1,58 y 1,40 ha. La altura del pasto se midió dos veces por semana con el objetivo de que la altura media de la hierba estuviese comprendida entre 6 y 15 cm. Los terneros del lote TC nacieron en la 2ª parte de la paridera de invierno. Tras el destete se introdujeron en una estabulación libre y se alimentaron con un silo de hierba de primer corte elaborado con el sistema de rotopacas y un concentrado comercial a libre disposición. En la Tabla 1 se recogen las fechas medias de nacimiento y la edad y peso medios al inicio de la suplementación y al destete.

Tanto el concentrado comercial (15,5% de PB, 2,5% de GB, 7,0% de FB y 7% de cenizas) como la harina de cebada (10,6% de PB, 1,6% de GB, 5,5% de FB y 4,1% de cenizas) se ofrecieron *ad libitum*. Una vez por semana se vaciaron las tolvas para calcular el consumo de cebada y concentrado del lote. Todos los animales se pesaron individualmente, una vez cada 15 días y antes de su traslado al matadero.

Inmediatamente después del sacrificio se registraron el peso de la canal caliente y las notas de conformación y engrasamiento (Reglamentos (CE) 1208/81 y 2273/91). A las 24 h del sacrificio se midió el pH del músculo *Longissimus dorsi* entre la 4ª y la 5ª vertebra lumbar. Una vez extraído el chuletero de la media canal izquierda se extrajo la chuleta correspondiente a la 6ª costilla. Esta chuleta se diseccionó para conocer su proporción de músculo, grasa y hueso. De la porción de chuletero restante se extrajo el músculo *Longissimus dorsi* y se tomaron cuatro muestras para la determinación de la oxidación de los lípidos (tras 6 días de exposición en bandejas cubiertas con un film permeable al oxígeno, se determinaron las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico –TBARS– según el método de Pfalzgraf et al. (1995)), del contenido en grasa intramuscular y del perfil de ácidos grasos, de los parámetros CIELAB de color (colorímetro Minolta CR-400, iluminante D65, observador 2º) y de la resistencia al corte con una sonda Warner-Braztler (texturómetro TA.XT plus, cocción en baño de agua hasta 70°C). Las muestras destinadas a la determinación del color y de la resistencia al corte se maduraron 6 días envasadas al vacío y en refrigeración.

La extracción de la grasa intramuscular se realizó según la técnica de Bligh y Dyer (1959) y la metilación de los ácidos grasos según IUPAC (1987). Los ésteres metílicos se

identificaron con un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL-FID con una columna Varian CPSil88 de 100m x 0,25mm x 0,2µm. Los lotes se compararon utilizando el procedimiento ANOVA del paquete estadístico SPSS 17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El consumo de harina cebada durante todo el periodo experimental (117 días de media) de los animales del lote TP fue de 209 kg de materia seca / animal. El consumo de concentrado de los animales del lote TC (123 días de media) fue de 608 kg de materia seca / animal.

No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los lotes TP y TC en el peso, conformación ni nota de engrasamiento de la canal (Tabla 2). Los animales del lote TC presentaron valores significativamente superiores ($P \leq 0,05$) para las variables ganancia media diaria de peso (GMD) total y 2 meses antes del sacrificio, % de grasa de la 6ª costilla y % de grasa intramuscular del músculo *Longissimus dorsi* (Tablas 2 y 3).

El lote TP presentó una tendencia ($P \leq 0,1$) a valores superiores de pH e inferiores de los parámetros de color índice de amarillo (b^*) y tono (h_{ab}) del músculo *Longissimus dorsi*. En concordancia con los resultados de otros trabajos (Humada et al., 2011), el lote TP presentó valores inferiores ($P \leq 0,05$) de AGS y del cociente n-6/n-3 y superiores ($P \leq 0,05$) de AGPI y del cociente AGPI/AGS. Como ya había sido observado en otros trabajos en los que se compara terneros alimentados en pastoreo frente a terneros alimentados con concentrados y forrajes conservados (Luciano et al., 2011), pese al mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados, más proclives a la oxidación, el lote TP presentó valores significativamente inferiores ($P \leq 0,05$) de TBARS. El valor medio de fuerza máxima de corte a los 7 días de maduración de la carne del lote TP fue superior al del lote TC, pero no se observaron diferencias significativas entre lotes ($P > 0,05$).

Las diferencias en el sistema de producción no se tradujeron en diferencias en el peso ni la calidad de la canal pero sí en el contenido en grasa inter e intramuscular, esperables dada la variación en el contenido energético de las raciones (Leheska et al., 2008; Humada et al., 2011). La grasa subcutánea de los animales acabados en pasto presentaría un color más amarillo (valores de b^* y C^* superiores ($P \leq 0,05$)) mientras que la carne presentaría una tendencia a valores de h_{ab} más desplazados hacia el rojo. Las diferencias en los valores de TBARS podrían implicar una vida útil más larga de la carne de los animales del lote TP. Los resultados también apuntan hacia la obtención de un perfil de ácidos grasos más favorable para la salud del consumidor en los animales acabados en pastoreo. En este lote los valores del ratio n-6/n-3 se ajustaron a las recomendaciones (entre 1 y 4) del Department of Health (1994). Estos resultados preliminares deben completarse con un estudio más exhaustivo del perfil de ácidos grasos y de las características organolépticas de la carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Bligh E.G., Dyer, W.J. 1959. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 1911–1912. •Department of Health. 1994. London: HMSO. •Humada M.J., Serrano E., Sañudo C., Rolland D.C., Dugan M.E.R. 2012. Meat Sci. 90: 678-685. •IUPAC 2301. 1987. Oxford: Blackwell. •Leheska J.M., Thompson L.D., Howe J.C., Hentges E., Boyce J., Brooks J.C., Shriver B., Hoover L., Miller M.F. 2008. J. Anim. Sci. 86: 3575-3585. •Luciano G., Moloney A.P., Priolo A., Röhrle F., Vasta V., Biondi L., López-Andrés P., Grasso S., Monahan F.J. 2011. J. Anim. Sci. 89: 3759-3768. •Pfalzgraf A., Frigg M., Steinhart H. 1995. J. Agric. Food Chem. 43: 1339-1342.

Agradecimientos: Operarios de la Finca Aranda. Cooperativa Agrocantabria. Personal y SVO del Matadero de Guarnizo. Becarios del Gobierno de Cantabria. Carolina Barquín. Laboratorio del CIFA. Servicio de Laboratorio y Control. Laboratorio Agroalimentario del MARM en Santander. Proy. INIA RTA 2007-00003-00-00. Prog. Doc-INIA 2008 (E. Serrano).

Tabla 1. Fecha de nacimiento, edad y peso al inicio de la suplementación (lote TP) y al destete (lote TC) (E.S.: error estándar).

	TP		TC	
	Media	E.S.	Media	E.S.
Fecha de nacimiento	3/1/10	10,3 días	16/3/10	3,0 días
Edad (días)	182	11,0	142	3,3
Peso (kg)	163	12,4	144	5,3

Tabla 2. Parámetros productivos, características de la canal y composición tisular de la 6ª costilla de los lotes TP (tudanca pasto) y TC (tudanca cebo).

	TP		TC		P
	Media	³ E.S.	Media	² E.S.	
Peso vivo al sacrificio (kg)	254,6	9,33	263,5	8,07	0,484
¹ GMD total (g)	842,1	38,74	1.085,8	39,57	0,001
¹ GMD 2 m presacrificio (g)	920,6	44,44	1.281,0	51,58	0,000
Peso de la canal caliente (kg)	138,6	5,40	141,5	3,78	0,670
Conformación (escala 1-18)	3,4	0,42	3,1	0,35	0,655
Engrasamiento (escala 1-5)	2,0	0,00	2,0	0,00	-
% de Grasa de la 6ª costilla	11,8	0,77	18,1	0,95	0,000

¹Ganancia media diaria de peso durante todo el periodo experimental (GMD total) y en los dos últimos meses del periodo experimental (GMD 2 m presacrificio); ² E.S.: error estándar.

Tabla 3. pH 24 horas postsacrificio, color de la grasa subcutánea, color y resistencia al corte a los 7 días de maduración, contenido en sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) tras 6 días de exposición al aire y contenido en grasa intramuscular y perfil de ácidos grasos del *Longissimus dorsi* de los lotes TP (tudanca pasto) y TC (tudanca cebo).

		TP		TC		P
		Media	⁶ E.S.	Media	⁶ E.S.	
pH 24 horas		5,60	0,047	5,44	0,053	0,060
Grasa subcutánea:	L*	70,72	1,211	69,37	0,717	0,430
	a*	6,28	0,847	4,78	0,466	0,163
	b*	11,33	0,373	6,70	0,285	0,000
	h _{ab}	61,72	3,248	54,82	2,872	0,166
	C*	13,14	0,539	8,32	0,360	0,000
<i>Longissimus dorsi</i>	L*	36,86	0,623	37,74	0,599	0,501
	a*	15,47	0,593	16,23	0,489	0,216
	b*	2,34	0,387	3,33	0,475	0,086
	h _{ab}	8,23	1,146	11,41	1,533	0,090
	C*	15,69	0,638	16,62	0,517	0,163
Fuerza máxima de corte (kg)		8,15	1,437	5,94	1,300	0,295
TBARS (mg/kg)		0,25	0,024	0,84	0,161	0,000
Grasa intramuscular (% MF)		1,41	0,104	2,90	0,426	0,010
Ácidos grasos (% ¹):	∑ AGS ²	41,90	0,912	48,18	0,529	0,000
	∑ AGMI ³	40,23	1,177	42,36	0,595	0,129
	∑ AGPI ⁴	17,87	1,720	9,46	0,785	0,001
	n-6 / n-3 ⁵	2,27	0,068	5,48	0,455	0,000
	AGPI/AGS	0,43	0,052	0,20	0,018	0,001

¹% en peso del total de ácidos grasos identificados; ²Ácidos grasos saturados; ³Ácidos grasos monoinsaturados; ⁴Ácidos grasos poliinsaturados; ⁵ Cociente entre AGPI de las series n-6 y n-3; ⁶ E.S.: error estándar.

TUDANCA CALVES PRODUCTION SYSTEMS

ABSTRACT: This work studies the effect of two production systems (pasture finishing of unweaned calves -TP group- vs. intensive indoors finishing of weaned calves -TC group-) on carcass quality, subcutaneous fat and meat colour, intramuscular fat content and fatty acid profile, lipid oxidation and meat shear force of Tudanca calves slaughtered at 9-10 months of age. Production system did not affect carcass quality. TP group presented lower ($P \leq 0,05$) intramuscular fat content, saturated fatty acid percentage and lipid oxidation after 7 days of oxygen exposition. TP fat was more yellow (higher ($P \leq 0,05$) b^* and C^* values) while TP meat tended to have ($P \leq 0,1$) lower b^* and h_{ab} values (that would imply more red meat).

Keywords: grass feeding, carcass quality, meat quality

EVOLUCIÓN POST-MORTEM DE LA TERNEZA DE CARNE DE TERNERA ECOLÓGICA FRENTE A CONVENCIONAL Y ESTUDIO PRELIMINAR DEL PERFIL PROTEOLÍTICO DURANTE LA MADURACIÓN

López, A.¹, García-Torres, S.¹, Tejerina, D.¹, Prior, E.¹, Cabeza de Vaca, M.¹, Fernández-Suárez, V.² y Oliván M.²

¹Centro de Inves. Finca "La Orden-Valdesequera". Dpto. Prod. Animal. 06187-Guadajira (Badajoz)

²SERIDA. Área de Sistemas de Prod. Animal. Ctra Oviedo s/n, 33300-Villaviciosa (Asturias)
Email: dologa19@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

De todos los atributos de textura, la terneza ha sido considerada como el principal factor de calidad de los productos cárnicos (Chrystall, 1994). Dicho atributo está influenciado tanto por factores intrínsecos como extrínsecos. Dentro de estos últimos, la alimentación es uno de los factores más influyentes en la calidad final del producto, debido al efecto regulador que la nutrición puede tener sobre procesos biológicos en el músculo (Descalzo *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de estudios científicos están centrados en las posibilidades de los sistemas de producción y sus variaciones (Nardone *et al.*, 2004) y especialmente en el sector de los consumidores (Briz y Ward, 2009; Ayuni y Rennie, 2012). Por el contrario, los estudios que comparan la calidad de los productos ecológicos frente a los producidos bajo sistema convencional son limitados (Kouba, 2003). El tiempo de maduración de la carne es otro factor fundamental para la adquisición de un grado de terneza adecuado debido al ablandamiento de la misma, que se atribuye a la degradación progresiva y selectiva de la estructura de las miofibrillas a causa de la acción de enzimas proteolíticas endógenas. En este trabajo, se estudió la evolución de la terneza de carne proveniente de terneros criados en distintos sistemas de producción (Ecológico a pasto y Ecológico a pienso frente a Cebo Convencional) a lo largo de la maduración post-mortem (0, 7, 14 y 21 días). Además, como objetivo complementario se planteó la búsqueda de marcadores peptídicos, mediante electroforesis vertical (SDS-PAGE), como indicadores de la tenderización.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo con un total de 40 terneros machos de raza Retinta que fueron utilizados y distribuidos en 3 lotes: 10 animales engordados de manera convencional, con alimento concentrado y (Lote Cebo Convencional, CC); 15 animales engordados con pienso y forraje ecológicos, (Lote Ecológico a pienso, EPI); y 15 animales engordados con pasto disponible en la dehesa y concentrado ecológico (Lote Ecológico a pasto, EPA).

Todos los terneros fueron sacrificados una vez alcanzados los 480-500 Kg de peso vivo. A las 24 h se extrajo músculo *Longissimus dorsi* (LD), que se dividió en cuatro partes destinadas a diferentes días de maduración. La parte correspondiente al día 0 (d0) fue fileteada, envasada al vacío y congelada a -20 °C hasta posteriores análisis. El resto de partes se maduraron a + 2-4 °C durante periodos de 7 días (d7), 14 días (d14) y 21 días (d21). Posteriormente al proceso de maduración se siguió el tratamiento de muestras anteriormente descrito.

La dureza de la carne se evaluó mediante una sonda de corte Warner-Bratzler (HDP/BS) estudiando la evolución de la Fuerza máxima (Kg) con la maduración. Se hicieron 10 determinaciones por muestra.

En cada lote de alimentación se seleccionaron los animales cuya carne presentó los valores extremos (máximo y mínimo) de dureza. En esta carne se estudió la evolución del perfil proteico a lo largo de la maduración, con el fin de detectar fragmentos peptídicos indicadores del proceso de tenderización. Este análisis se realizó en el extracto miofibrilar de la carne, obtenido según el protocolo de Bjarnadóttir *et al.* (2010), valorándose la concentración total de proteína por espectrofotometría a 750 nm, con el kit comercial de Bio-Rad (RC-DC Protein Assay), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

La electroforesis vertical se realizó en geles SDS-PAGE, siguiendo el procedimiento descrito por Sierra *et al.* (2012). Para la determinación de los pesos moleculares de cada banda se usó el patrón Precision Plus Protein™ (Bio-Rad). Para la separación de proteínas se aplicó un voltaje creciente de 80 V (2 h), 160 V (2 h), 250 V (12 h) y 500 V (20 min) (Universal PowerPack 500, Bio-Rad). Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-

250, se destiñeron y se realizó la cuantificación de cada banda peptídica por densitometría óptica (Quantity One, Bio-Rad), expresándose los resultados como intensidad relativa respecto al total de bandas detectadas en cada calle (tiempo de maduración).

Para estudiar los efectos “Sistemas de producción” y “Tiempo de maduración” sobre la dureza de la carne y los fragmentos peptídicos detectados, se llevó a cabo un Análisis de la Varianza (ANOVA) en SPSS 15.0 (SPSS, 2006). Para las variables en las que se observaron diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó un test de Tukey para comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron una disminución progresiva ($p < 0.001$) de la dureza de la carne a lo largo de la maduración (Tabla 1), siendo a d7 el momento en el que se produce un descenso significativo de la Fuerza máxima. Este efecto fue similar al descrito por Accioli *et al.* (1995) y Sañudo *et al.* (2004). Sin embargo, no hubo un efecto significativo del sistema productivo sobre la dureza, probablemente debido a la alta variación individual dentro de cada grupo (Figura 1), aunque sí se observó una tendencia de la carne producida en el sistema convencional (CC) a mostrar mayor dureza a lo largo de la maduración (Tabla 1, Figura 1).

	DÍA DE MADURACIÓN				SISTEMA DE PRODUCCIÓN (S.P.)			EEM	P	
	d0	d7	d14	d21	CC	EPI	Epa		DIA	S.P.
	F. Máx. (Kg)	9,56 a	8,19 a	6,39 b	5,14 b	7,85	6,78	7,25	0,24	***

EEM, error estándar de la media. Estadísticos descriptivos expresados como medias. *** $p \leq 0.001$; ns $p \geq 0.05$

Tabla 1. Efecto del tiempo de maduración y el sistema de producción en la dureza (F. Máx.) de la carne.

Tal y como muestra la Figura 1, la carne proveniente de animales criados en sistemas de producción ecológicos, partiendo de un grado de dureza similar, presentó una tenderización mayor que la carne proveniente de animales criados de manera convencional. De esta forma, si se calcula el grado de ablandamiento total de la carne a lo largo de los 21 días de maduración estudiados, la carne producida en los sistemas ecológicos mostró un 48% de ablandamiento global, respecto al 38% registrado en la carne del sistema convencional. Esta diferencia fue especialmente acusada a d7, momento en el que esta carne tenía un grado de tenderización superior (14-20% vs 4%, EI-EE vs CC).

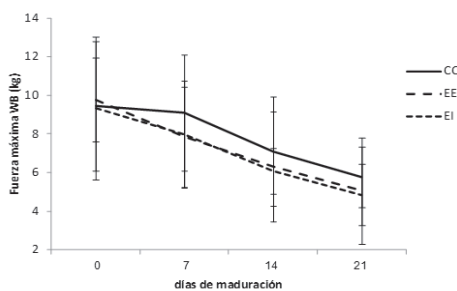


Figura 1. Evolución de la dureza durante la maduración en cada sistema de producción

La Figura 2 muestra el patrón peptídico del extracto miofibrilar de dos tipos de carnes con valores extremos de dureza (d= carne más dura, b= carne más blanda). Destacan las bandas M16 y M17, que corresponden a la Troponina T (36-37 kDa), que se van fragmentando a lo largo de la maduración, dando lugar a bandas de mayor movilidad electroforética, como la M23, que corresponde con un fragmento de Troponina T de menor peso molecular (30kD), descrito previamente como marcador de proteólisis (Huff-Lonergan

et al. 1996; Sierra *et al.* 2012). La evolución del perfil peptídico a lo largo de la maduración fue similar entre las carnes con valores extremos de dureza, aunque mostraron una escala temporal distinta, con una degradación peptídica más temprana en las carnes más blandas.

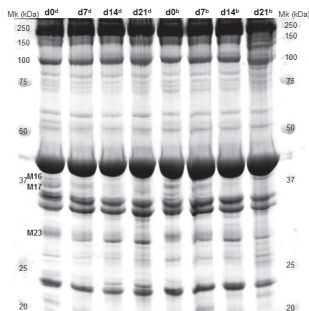


Figura 2. Imagen de un gel SDS-PAGE de dos extractos de proteínas miofibrilares y evolución de los fragmentos proteicos durante la maduración

En conclusión, la dureza de la carne disminuyó significativamente entre d7 y d14, siendo a d7 más blanda la carne proveniente de los sistemas de producción ecológicos. Como marcadores peptídicos, se observó la desaparición de las bandas correspondientes a la Troponina-T (M16 y M17) y simultánea aparición de otra banda (M23) como producto de su fragmentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioli, A., Franci, O., Sargentini, C., Pugliese, C., Bozzi, R., & Lucifero, M. 1995. Congreso Nazionale ASPA-Grado: 359–360
- Ayuni, F. & Rennie, D. 2012. *Procedia-Social and Behav. Sci.* 49: 360-367
- Bjarnadó, S. G., HollunG, K., Mosleth, E.. 2010. *J. Agric. Food Chem.* 58: 7408–7414
- Briz, T. & Ward, R.W. 2009. *Food Policy* 34: 295-304
- Chrystall, B.B. 1994. *Advance in Meat Res.* 9: 316-336
- Descalzo, A.M., Rossetti, L., Grigioni, G., Irueta, M., Sancho, A.M. & Carrete, J. 2007. *Meat Sci.* 75: 299-307
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Parrish, F.C. & Robson, R.M. 1996. *J Anim Sci* 74: 779–785
- Kouba, M. 2003. *Livestock Production Sci.* 80: 33-40
- Sañudo, C., Macie, E.S., Olleta, J.LI., Villarroel, M., Panea, B. & Albertí, P. 2004. *Meat Sci.* 66: 925-932
- Sierra, V., Fernández-Suárez, V., Castro, P., Osoro, K., Vega-Naredo, I., García-Macia, M., Rodríguez-Colunga, P., Coto-Montes, A. & Oliván, M. 2012. *J. Sci. Food Agric.* 92: 2727-2740

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2009-0122-C03-01 y Adoración López Gajardo agradece a INIA su beca predoctoral.

POSTMORTEM EVOLUTION OF TENDERNESS IN ORGANIC MEAT VERSUS CONVENTIONAL MEAT AND PRELIMINARY STUDY OF PROTEOLYTIC PROFILE DURING AGEING

ABSTRACT: The ageing time of the meat is essential for acquisition of a suitable degree of tenderness. It's attributed to the progressive degradation of the myofibrillar structure due to the action of endogenous proteolytic enzymes. Furthermore, the type of feeding may influence the characteristics of the muscle as the texture of the meat. In this work, we studied the evolution of the tenderness on meat from calves reared under different production systems (Epi and EPa vs CC) during postmortem maturation. Another aim was search peptide markers by vertical electrophoresis (SDS-PAGE), as indicators of tenderization. The results showed a significant increase in tenderness after d7, and the trend of the meat of animals feeded in both ecological systems to tender earlier. The electrophoretic profile analysis myofibrillar meat extract showed proceeds as maturation occurs a progressive disappearance of the bands of Troponin-T of 36-38 kDa, appearing smaller fragments (30 kDa), which confirms the important role of this protein as a marker of tenderization.

Keywords: organic-beef, tenderness, ageing, proteolysis

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA SUBCUTÁNEA EN TERNEROS LIMUSÍN Y TUDANCA x CHAROLÉS PRODUCIDOS EN EL VALLE DEL NANSA (CANTABRIA)

Aldai¹, N., Lavín², P., Jaroso², R., Sanchez-Briñas³, B. y Mantecón², A.R.

¹Centro de Investigación LASCARAY Ikergete, UPV/EHU, 01006 Vitoria-Gasteiz.

noelia.aldai@ehu.es

²IGM (CSIC). Finca Marzanas, 24346 Grulleros (León).

³Fundación Botín, C/ Pedrueca 1, Santander.

INTRODUCCIÓN

La producción de ganado vacuno de carne del valle del Nansa (montaña cántabra), caracterizado por su gran diversidad racial, se basa, principalmente, en la venta de los animales como pasteros para ser cebados en otras explotaciones (Lavín et al., 2011a). Si bien este sistema tiene la ventaja de disminuir la inversión y los gastos de las explotaciones, tiene el inconveniente de reducir los ingresos y ser dependiente de una cadena de comercialización tradicional de tratantes que actúan prácticamente en forma de monopolio (Lavín et al., 2011b). Como alternativa se propuso la venta directa de canales procedentes de terneros lechales a diferencia de la venta de animales para su cebo en otras regiones. Teniendo en cuenta el efecto del genotipo y de la alimentación en la calidad del producto (Aldai et al., 2007, 2011) se estudiaron aspectos como el rendimiento de la canal, rendimiento carnicero, calidad de la carne y perfil de ácidos grasos (AG) del músculo (grasa intramuscular) (Aldai et al., 2012) y grasa subcutánea (SC). En este trabajo se compara la composición de AG de la grasa SC de ternera obtenida de los dos genotipos más frecuentes en la zona (Tudanca x Charolés y Limusín).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 12 terneros machos nacidos en primavera (marzo-abril 2010) procedentes de dos explotaciones de vacuno del valle del Nansa (Cantabria) integradas en el Proyecto de Promoción Ganadera que la Fundación Botín lleva a cabo en esta zona, como parte de su Programa de Desarrollo Rural, Patrimonio y Territorio, y pertenecientes a los genotipos Limusín y cruce de Tudanca (vaca) x Charolés (toro) (n=6 por genotipo). Los terneros fueron criados en condiciones de pastoreo y lactancia natural con sus madres y suplementados con pienso a libre disposición (max. 3 kg/día) desde los 80 días de edad hasta el sacrificio (7 meses). Para la suplementación del pienso se utilizaron tolvas de exclusión que permitían el paso de los terneros pero no el de las vacas. El pienso concentrado estuvo constituido por: 40% maíz, 45% cebada, 10% soja, 2% grasa y 3% vit+min, y su composición en materia seca fue: 16,2% proteína bruta, 6,7% cenizas y 3,9% extracto etéreo). El perfil de AG mayoritarios fue: 18% 16:0, 2,1% 18:0, 20% 9c-18:1, 50% 18:2n-6, y 3,3% 18:3n-3 (Alves et al., 2008). El sacrificio de los animales se llevó a cabo en el matadero de Liébana (Cantabria).

Para la determinación de AG se analizó la grasa SC procedente de la 6ª costilla. Se liofilizaron 50 mg de grasa de cada muestra y se llevó a cabo una transmetilación directa con metóxido de sodio en metanol (0,5N). Los AG metilados se analizaron por GC-FID (Agilent 7890A) y 2 columnas cromatográficas de 100m; la SP-2560 para el perfil total (Kramer et al., 2008) y la SLB-IL111 para los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA; Delmonte et al., 2011). Para la identificación de los AG se emplearon los estándares #463, #603 y #UC-59M de Nu-Chek Prep Inc., mientras que algunos AG se identificaron de acuerdo a los tiempos de retención y al orden de elución descritos en la bibliografía (Cruz-Hernandez et al., 2004; Kramer et al., 2008; Delmonte et al., 2011).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS 19 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los AG (en porcentaje del total de AG) de la grasa SC. Se han representado los grupos y ratios nutricionalmente más interesantes junto con algunos de los AG individuales representativos (mayoritarios) de cada uno de los grupos. En general, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos excepto en el caso del CLA total donde la grasa procedente de animales de la raza Limusín obtuvo un mayor porcentaje ($P<0.05$). Además, el ácido ruménico (9cis,11trans-18:2), siendo el isómero de CLA

mayoritario en ambos genotipos, fue también significativamente mayor en la grasa de Limusín ($P<0.05$).

Tabla 1. Efecto del genotipo (Tudanca x Charolés y Limusín) en la composición de ácidos grasos (AG) de la grasa subcutánea de ternera (% del total de AG)¹

	Tudanca x Charolés		Limusín		Sign.
Σ AGS	49,62	(1,128)	48,81	(1,030)	ns
Σ AGR	2,09	(0,098)	2,13	(0,090)	ns
Σ AGM	45,02	(0,955)	45,44	(0,872)	ns
Σ cis-AGM	38,25	(1,021)	37,95	(0,932)	ns
Σ trans-AGM	6,77	(0,388)	7,48	(0,354)	ns
10t-18:1	0,89	(0,447)	1,43	(0,408)	ns
11t-18:1	2,97	(0,237)	3,35	(0,216)	ns
11t-/10t-	5,88	(1,733)	4,56	(1,582)	ns
Σ AGP	2,67	(0,264)	2,43	(0,241)	ns
Σ n-6	1,91	(0,266)	1,75	(0,243)	ns
18:2n-6	1,75	(0,263)	1,60	(0,240)	ns
20:4n-6	0,04	(0,002)	0,03	(0,002)	ns
Σ n-3	0,76	(0,040)	0,68	(0,036)	ns
18:3n-3	0,65	(0,042)	0,57	(0,039)	ns
20:5n-3	0,02	(0,002)	0,02	(0,002)	ns
22:5n-3	0,05	(0,014)	0,06	(0,013)	ns
n-6/n-3	2,54	(0,458)	2,65	(0,418)	ns
P/S	0,05	(0,006)	0,05	(0,005)	ns
Σ CLA	1,58	(0,153)	2,15	(0,140)	*
9c,11t-18:2	1,29	(0,135)	1,82	(0,123)	*
Σ NC-18:2	1,18	(0,082)	1,20	(0,075)	ns

¹Valor medio (error estándar). *, $P<0,05$; ns, no significativo. AGS, AG aturados; AGR, AG ramificados; AGM, AG monoinsaturados; AGP, AG poliinsaturados; P/S, AGP/AGS; CLA, conjugados del linoleico; NC-18:2, otros dienos.

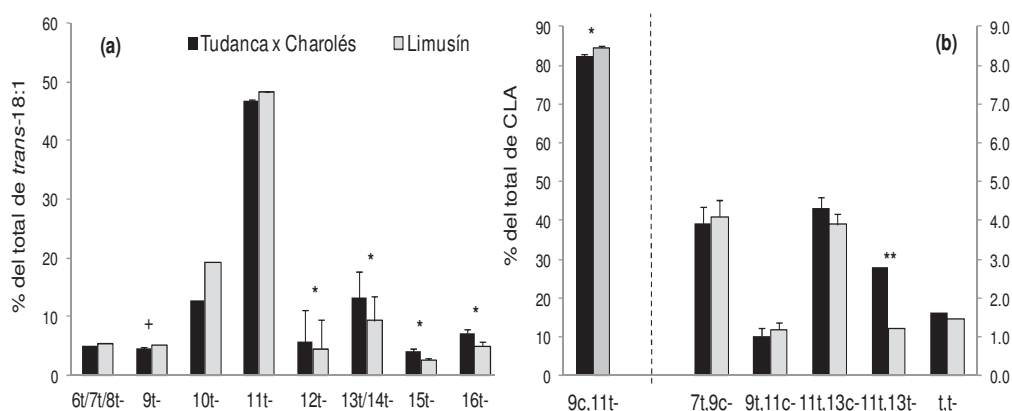


Figura 1. Efecto del genotipo (Tudanca x Charolés y Limusín) en el porcentaje relativo de cada isómero respecto al total de *trans*-18:1 (a) y al total de CLA (b) de la grasa subcutánea de ternera.

Dado que los terneros de ambos genotipos fueron criados en condiciones de pastoreo, la mayor parte del total de AG *trans* y CLA estuvo constituido por el ácido vaccénico (11*trans*-18:1, 47,5%; Figura 1a) y ácido ruménico (9*cis*,11*trans*-18:2, 83,2%; Figura 1b), respectivamente. En otras situaciones donde la alimentación ha sido a base de concentrado se ha visto que el isómero *trans* mayoritario suele ser el 10*trans*-18:1 (Dugan et al., 2007; Humada et al., 2012), isómero sobre el cual no actúa la enzima Δ 9-desaturasa imposibilitando su conversión en CLA. Por otra parte, aunque el 9*trans*-18:1 fue un poco inferior en la grasa de Tudanca x Charolés, otros como 12*trans*-, 13/14*trans*-, 15*trans*- y 16*trans*-18:1 fueron significativamente mayores, los cuales son metabolitos que se asocian principalmente a la biohidrogenación del 18:3n-3 (Bessa et al., 2007; Nassu et al., 2011). En cuanto a los isómeros del CLA (Figura 1b) hubo pocas diferencias significativas únicamente asociadas al ácido ruménico ($P < 0.05$) y al 11*trans*,13*trans*-18:2 ($P < 0.05$). En general, la composición en AG de la grasa SC de ambos genotipos estudiados fue similar salvo algunas ligeras apreciaciones posiblemente relacionadas con la mayor ingestión de concentrado (18:2n-6) en el caso de animales de la raza Limusín. En ambos genotipos el perfil de AG fue más saludable en comparación con animales de cebo intensivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldai, N., Dugan, M.E.R., Kramer, J.K.G., Martínez, A., López-Campos, O., Mantecón, A.R. & Osoro, K. 2011. *Animal* 5: 1643-1652.
- Aldai, N., Lavín, P., Kramer, J.K.G., Jaroso, R. & Mantecón, A.R. 2012. *Meat Sci* 92: 687-696.
- Aldai, N., Nájera, A.I., Dugan, M.E.R., Celaya, R. & Osoro, K. 2007. *Meat Sci* 76: 682-691.
- Alves, S.P., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M. & Bessa, R.J.B. 2008. *J. Chrom. A* 1209: 212-219.
- Bessa, R.J.B., Alves, S.P., Jerónimo, E., Alfaia, C.M., Prates, J.A. & Santos-Silva, J. 2007. *Eur. J. Lipid Sci Tech.* 109: 868-878.
- Cruz-Hernandez, C., Deng, Z., Zhou, J., Hill, A.R., Yurawecz, M.P., Delmonte, P., Mossoba, M.M., Dugan, M.E.R. & Kramer, J.K.G. 2004. *J. AOAC Int.* 87: 545-562.
- Delmonte, P., Fardin Kia, A.R., Kramer, J.K.G., Mossoba, M.M., Sidisky, L. & Rader, J.I. 2011. *J. Chrom. A* 1218: 545-554.
- Dugan, M.E.R., Kramer, J.K.G., Robertson, W.M., Meadus, W.J., Aldai, N. & Rolland, D.C. 2007. *Lipids* 42: 509-518.
- Humada, M.J., Serrano, E., Sañudo, C., Rolland, D.C. & Dugan, M.E.R. 2012. *Meat Sci.* 90: 678-685.
- Kramer, J.K.G., Hernandez, M., Cruz-Hernandez, C., Kraft, J. & Dugan, M.E.R. 2008. *Lipids* 43: 259-273.
- Lavín, P., Jaroso, R., Palencia, P. & Mantecón, A.R. 2011a. *ITEA* 1: 67-69.
- Lavín, P., Jaroso, R., Palencia, P. & Mantecón, A.R. 2011b. *ANEMBE*, pp. 217-219.
- Nassu, R.T., Dugan, M.E.R., He, M.L., McAllister, T.A., Aalhus, J.L., Aldai, N. & Kramer, J.K.G. 2011. *Meat Sci.* 89: 469-477.

Agradecimientos: Trabajo realizado en el desarrollo del Convenio entre la Fundación Botín (Programa de Desarrollo Rural) y el CSIC (2010-2013) para el estudio y desarrollo de un sistema de producción y comercialización de carne de vacuno en el valle del Nansa y Peñarrubia. Agradecimiento a Semark AC Group, S.A., por la colaboración en la realización de este trabajo. También se agradecen los contratos de investigación financiados por la UE (Marie Curie – SPACANBEEF, PIOF-GA-2008-220730) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación e UPV/EHU (Programa Ramón y Cajal, RYC-2011-08593).

BACKFAT FATTY ACID COMPOSITION OF CALVES FROM LIMOUSIN AND TUDANCA x CHAROLAIS GENOTYPES PRODUCED IN NANSÁ VALLEY (CANTABRIA)

ABSTRACT: This study was designed to compare the fatty acid composition of backfat from veal produced from 'Tudanca x Charolais' cross (n=6) and Limousin (n=6) breeds when allowed to feed freely on mountain pastures and suckled naturally their mothers from birth to 7 months of age. After 80 days of age calves also had access to concentrate (maximum of 3 Kg/day), while cows did not. In general, very few differences were observed between backfat profiles of both genotypes except for slight differences in some of the individual *trans*-18:1 and CLA isomers. Moreover, vaccenic and rumenic acids were the major *trans* double bond containing biohydrogenation isomers in all animals making their fat healthier in comparison to fat obtained from concentrate fed animals.

Keywords: *trans*, CLA, veal, genotype.

RENDIMIENTO COMERCIAL DE TERNEROS PRODUCIDOS DE RAZAS TUDANCA, LIMUSÍN, ASTURIANA DE LA MONTAÑA Y CRUCE DE TUDANCA POR CHAROLES

Lavín¹, P., Jaroso¹, R., Aldai², N., Sanchez-Briñas³, B. y Mantecón¹, A.R.

¹IGM (CSIC). Finca Marzanas 24346 Grulleros (León). paz.lavin@eae.csic.es.

²Centro de Investigación LASCARAY Ikergeunea, UPV/EHU, 01006 Vitoria-Gasteiz

³Fundación Botín, C/ Pedrueca 1, Santander.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción de vacuno de carne el valor final de los animales se establece, en general, en términos del precio por kg de canal, en función de las características de conformación y engrasamiento como parámetros de fácil medida e indicativos de algunas características de la carne y, sobre todo, del rendimiento comercial posterior de la canal. En este sentido, conocer la cantidad de carne comercializable que se puede obtener de una canal y la proporción de sus piezas supone un avance en el establecimiento de futuros criterios de negociación del valor de los animales sacrificados. El factor genético es uno de los múltiples aspectos que pueden afectar al rendimiento comercial de la canal de ganado vacuno (Albertí *et al.*, 2001), que adquiere especial importancia en muchas zonas de montaña, tradicionales productoras de vacuno de carne, por la diversidad genética existente (Lavín *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo es la comparación de las características de la canal y los rendimientos de la canal al envasado de los genotipos más frecuentes (raza Tudanca, Limusín, Asturiana de la Montaña y el cruce de Tudanca x Charoles) en las explotaciones de ganado vacuno del valle del Nansa y Peñarrubia (Cantabria).

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se utilizaron datos de 92 terneros machos de los genotipos: Tudanca (n=23), Limusín (n=30), Asturiana de la Montaña (n=19) y el cruce Tudanca x Charolés (n=20), pertenecientes a ocho explotaciones de vacuno de la montaña del valle del Nansa y Peñarrubia (Cantabria) integradas en el Proyecto de Promoción Ganadera que la Fundación Botín lleva a cabo en esta zona, como parte de su Programa de Desarrollo Rural, Patrimonio y Territorio. Todos los terneros fueron sacrificados durante el año 2011 y 2012 y habían sido criados en condiciones de pastoreo y lactancia natural con sus madres y suplementados con pienso a libre disposición hasta que se sacrificaron cuando alcanzaron un engrasamiento considerado óptimo, a una edad media de 8 meses. Una vez sacrificados los animales en el matadero de Liébana (Cantabria) se obtuvo información del peso de la canal y la clasificación subjetiva de conformación (escala de 1 a 18 puntos) y estado de engrasamiento (escala de 1 a 15 puntos) de acuerdo con la clasificación europea (SEUROP). Transcurrido el periodo de maduración de 5 días se realizó el despiece comercial y se pesaron todas las piezas obtenidas, cuya suma permitió calcular el peso de la carne envasada; la expresión de este valor como porcentaje de la canal dio lugar al rendimiento durante el envasado de la canal. El despiece se llevó a cabo por la empresa Semark AC Group, S.A. para la venta en su cadena de Supermercados LUPA. En el trabajo se indican los valores correspondientes a las piezas que adquieren mayor valor en el mercado pertenecientes a la categoría Extra (solomillo y chuleta) y Primera (tapa, babilla, cadera, contra y aguja). Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico SPSS. V.19.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estado de engrasamiento de la canal (valor medio de 4,3) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre razas, al seleccionarse los animales que fueron al matadero en el momento que alcanzaron un índice de engrasamiento *in vivo* óptimo, teniendo en cuenta que canales con un mismo nivel de grasa de cobertura son muy homogéneas en su composición (Espejo *et al.*, 2000). Como se puede observar en la Tabla 1, al mismo nivel de engrasamiento, la edad de sacrificio de los terneros presentó diferencias estadísticamente significativas entre razas con un periodo de 49 días menos de tiempo requerido para un engrasamiento óptimo en el genotipo Limusín en relación con la

raza Asturiana de la Montaña que alcanza el valor máximo, presentando la raza Tudanca y el cruce Tudanca x Charoles un valor intermedio, datos similares a los presentados por Serrano et al (2012) en terneros de raza Tudanca al mismo peso de la canal.

Tabla 1. Características de la canal y rendimiento comercial según la raza de los terneros.

		Tudanca	Limusín	Asturiana Montaña	Tudanca x Charoles	Sign.
Edad (días)		244,8 ^b ±5,27	215,9 ^a ±2,43	264,7 ^c ±7,59	235,9 ^b ±6,40	***
Conformación (SEUROP 1-18)		5,8 ^a ±0,18	9,8 ^c ±0,19	7,3 ^b ±0,18	7,3 ^b ±0,20	
Engrasamiento (1-15)		4,6 ±0,23	4,1 ±0,18	4,2 ±0,20	4,2 ±0,24	NS
Peso canal fría (kg)		140,7 ^a ±3,16	181,2 ^c ±3,28	149,2 ^{ab} ±3,62	154,7 ^b ±3,24	***
Peso envasado canal (kg)		106,1 ^a ±2,56	143,6 ^c ±2,75	115,4 ^b ±3,10	118,9 ^b ±2,68	***
Rendimiento al envasado canal (%)		75,3 ^a ±0,30	79,2 ^c ±0,48	77,2 ^b ±0,25	76,8 ^b ±0,39	***
<i>Extra (%)</i>	Solomillo (%)	1,9 ^a ±0,03	2,0 ^b ±0,03	2,0 ^b ±0,02	2,0 ^b ±0,04	**
	Chuleta (%)	10,6 ±0,16	10,5 ±0,21	10,1 ±0,14	10,4 ±0,27	NS
<i>Primera (%)</i>	Tapa (%)	6,6 ^a ±0,06	8,1 ^c ±0,12	6,7 ^a ±0,06	7,5 ^b ±0,12	***
	Babilla (%)	4,3 ^a ±0,07	5,0 ^b ±0,08	4,4 ^a ±0,04	4,8 ^b ±0,08	***
	Cadera (%)	3,6 ^a ±0,04	4,2 ^b ±0,07	3,8 ^a ±0,04	4,0 ^b ±0,07	***
	Contra (%)	8,3 ^a ±0,06	10,3 ^c ±0,16	8,6 ^a ±0,08	9,5 ^b ±0,13	***
	Aguja (%)	5,8 ^c ±0,11	4,5 ^a ±0,13	6,1 ^c ±0,11	5,0 ^b ±0,19	***

** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), NS ($p > 0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la clasificación de la conformación de los animales se observaron diferencias estadísticamente significativas entre razas, con un mayor valor en la raza Limusín (U-) y un menor en la raza Tudanca (O+), mostrando las razas Asturiana de la Montaña y el cruce Tudanca x Charoles valores intermedios (R-). La conformación de las canales presentó una correlación positiva ($p < 0,01$) tanto con el peso de la canal fría ($r = 0,613$), como con el peso envasado ($r = 0,639$) y el rendimiento al envasado de la canal ($r = 0,434$). Mostrando todos estos parámetros diferencias estadísticamente significativas entre razas, de forma que el peso envasado de la canal resultado del despiece fue un 35,3% superior en la raza Limusín en relación a la raza Tudanca, significativamente diferente a los valores intermedios observados en la raza Asturiana de la Montaña y el cruce de Tudanca x Charoles, presentando el mismo patrón de diferenciación entre razas que la indicada para la clasificación de conformación. El patrón se mantuvo igualmente cuando se analizó el rendimiento al envasado de la canal o porcentaje de carne vendible que alcanzan un valor máximo en la raza Limusín (79,2%) superando en 3,9 puntos porcentuales a la raza Tudanca, y obteniendo valores intermedios la raza Asturiana de la Montaña y el cruce

Tudanca x Charolés entre los que las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En todos los casos los valores fueron superiores a los datos medios del porcentaje de carne vendible de terneros (73,1%) presentados por Alberti et al (2001) en la comparación de siete razas bovinas Españolas o similares según su estado de conformación a los presentados por Carballo et al (2000) en terneros de raza Rubia Gallega. Como se muestra en la tabla 1, en el porcentaje de la canal que suponen las distintas piezas obtenidas, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre razas en todas las piezas analizadas, exceptuando la chuleta. Las piezas comerciales de primera categoría (Tapa, Babilla, Cadera y Contra) en porcentaje de la canal no discriminó entre la raza Tudanca y la raza Asturiana de la Montaña, presentando ambas el menor porcentaje y diferenciándose de forma estadísticamente significativa con la raza Limusín que presentó el mayor valor en las piezas Tapa y Contra, diferente estadísticamente con el cruce Tudanca x Charoles que presentó un valor intermedio, mientras que en las piezas Babilla y Cadera la raza Limusín no se diferenció de forma estadísticamente significativa con el cruce de Tudanca x Charolés. Sin embargo el porcentaje que supone de la canal el conjunto de las piezas de mayor valor (Extra + Primera) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre razas. La producción de terneros jóvenes a igual estado de engrasamiento permite obtener un buen rendimiento de la canal en relación a la carne envasada obtenida del despiece comercial en todas las razas estudiadas, teniendo una relación directa con la conformación de los animales y presentando los mejores valores en la raza Limusín, intermedios en las razas Asturiana de la Montaña y cruce de Tudanca x Charolés y más bajos en la raza Tudanca. En todos los casos las canales fueron bien valoradas por las estructuras de comercialización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertí, P., Sañudo, C., Olleta, J.L, Panea, B., Lahoz, F. 2001. ITEA 22 (extra): 511-513.
- Carballo, J.A., Oliete, B., Moreno, T., Sanchez, L., Monserrat, L. 2004. Arch. Zootec. 53: 119-128.
- Espejo, M., García, S., López, M.M., Izquierdo, M., Robles, A., Costela, A. (2000). In: Cañeque, V.; Sañudo, C. Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes. Madrid: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Cap.2, p.68-80.
- Lavín, P., Jaroso, R., Palencia, P., Mantecón, A.R. 2011. ITEA 1: 67-69.
- Serrano, E., Humada, M.J., Campos, M.V., Cimadevilla, C. (2012). ANEMBE. Pp 194-196.

Agradecimientos: Trabajo realizado en el desarrollo del Convenio entre la Fundación Botín (Programa de Desarrollo Rural) y el CSIC (2010-2013) para el estudio y desarrollo de un sistema de producción y comercialización de carne de vacuno en el valle del Nansa y Peñarrubia. Agradecimiento a Semark AC Group, S.A., por la colaboración en la realización de este trabajo. También se agradece el contrato Ramón y Cajal (RYC-2011-08593) al Ministerio de Ciencia e Innovación y a la UPV/EHU.

COMMERCIAL YIELD OF CALVES PRODUCED FROM TUDANCA, LIMOUSIN, ASTURIANA DE LA MONTAÑA AND TUDANCA x CHAROLAIS GENOTYPES

ABSTRACT: The objective of the present work was to compare the carcass parameters and commercial yields (% of boxed veal) of 92 male calves from the following genotypes: Tudanca, Limousin, Asturiana de la Montaña and Tudanca x Charolais cross. Calves naturally suckled their mothers in mountain pastures while they also had free access to concentrate (not the cows). Calves were slaughtered at an average of 8 months, when they reached an adequate degree of fat cover. The results showed that calf production up to a similar carcass fatness degree provides an adequate carcass yield in terms of % of boxed veal in all studied genotypes, and values were directly related to carcass conformation. Limousin calves provided the best carcass and meat yields while Tudanca calves provided the lowest. Intermediate values were reached by Asturiana de la Montaña and Tudanca x Charolais cross. In general, carcasses from all genotypes were positively evaluated within the commercialization chain.

Keywords: conformation, yield, veal, genotype.

EFFECTO DEL TIEMPO DE ESTANCIA EN CEBADERO Y DE LA EDAD DE SACRIFICIO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA DE CORDEROS DE RAZA RASA ARAGONESA

Campo, M.M.¹, Resconi, V.C.¹, Conesa, A.², Horcas, E.³ y Sañudo, C.¹

¹ Dep. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, 50013-Zaragoza. marimar@unizar.es

² CRIGP Ternasco de Aragón, MercaZaragoza 50014-Zaragoza

³ Pastores Grupo Cooperativo, MercaZaragoza 50014-Zaragoza

INTRODUCCIÓN

El sistema de producción de carne ovina en España ha evolucionado enormemente, instaurándose una etapa previa al sacrificio en un cebadero común donde los animales se clasifican según unas características determinadas para mejorar la homogeneidad del producto y la renta del ganadero. Este cambio en el manejo va asociado también a cambios en la alimentación tradicional, que es uno de los aspectos que más influyen en la composición de ácidos grasos de los tejidos adiposos en corderos ligeros, aunque también dicha composición depende de la edad, la raza, el engrasamiento de las canales o el peso al sacrificio (Horcada *et al.*, 2009; Juárez *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2007). Sin embargo, utilizar muestras de tejido muscular sistemáticamente para analizarla es costoso y depreciaría la canal. Por ello, la valoración de la composición de ácidos grasos podría realizarse en otros depósitos adiposos, como la grasa interna o la subcutánea del rabo, lo que no afectaría a la comercialización del producto. El objetivo principal del estudio es analizar la influencia que la edad de sacrificio y el tiempo de estancia en un cebadero común tienen sobre la composición en ácidos grasos de dos depósitos adiposos cuyo análisis no suponga una depreciación de la canal, en corderos de raza Rasa Aragonesa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 42 corderos de raza Rasa Aragonesa, 20 machos y 22 hembras, procedentes de la misma explotación y distribuidos aleatoriamente en cuatro lotes dependiendo del tiempo de estancia en el cebadero del centro de clasificación de Pastores S.C. en Monegrillo (1 ó 20 días) y de la edad de sacrificio (67 ó 107 días), en un diseño factorial 2x2. Los animales fueron destetados el día de su traslado al centro de clasificación. Aquellos animales del lote de 1 día de cebo fueron sacrificados al día siguiente de su llegada al cebadero. El sacrificio se realizó en las instalaciones del matadero homologado de MercaZaragoza. Tras 24h, se tomó el peso de las canales y se obtuvieron muestras de grasa subcutánea de la base de la cola y de la grasa renal, que se envasaron al vacío y congelaron hasta su análisis. El análisis de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases en el laboratorio Galeno & Vidal. Los datos, en porcentaje de ácidos grasos identificados, se analizaron mediante un GLM en el paquete estadístico SPSS, con tiempo en cebadero y edad de sacrificio como efectos fijos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición en ácidos grasos de la grasa renal se muestra en la Tabla 1. Para la composición en ácidos grasos fue, globalmente, más importante el tiempo de estancia del animal en el cebo común que la edad de sacrificio. Sólo el porcentaje de ácido esteárico no se vio afectado por ninguno de los efectos analizados.

Sacrificar a los animales a los 107 días disminuyó los porcentajes de ácidos láurico, oleico y α -linolénico, aumentando el de palmítico, lo cual no se tradujo en diferencias significativas de la saturación de la grasa, aunque sí del porcentaje en ácidos grasos $n-3$, que se redujo, con el consiguiente aumento significativo de la relación $n-6/n-3$ ($p < 0,001$). El pienso del cebo está basado en cereales y leguminosas, pobre en ácidos grasos $n-3$, por lo que al no estar pastando los animales de más edad, que ingirieron pienso durante más tiempo, vieron reducido el porcentaje de dichos ácidos grasos en la grasa.

En cambio, el hecho de tener un periodo de cebo común de 20 días redujo el porcentaje en ácidos grasos C12:0, C14:0 y C16:0 debido al incremento en el porcentaje de C18:2 $n-6$ y, especialmente, al aumento del porcentaje en C18:1 $n-9$, que repercutió en un aumento de 4 puntos porcentuales en la monoinsaturación de la grasa renal respecto a aquellos animales

que se sacrificaron al día siguiente tras el destete sin pasar por un cebo común. La mayor insaturación de los ácidos grasos del pienso que recibieron los animales en cebadero, frente al que tomaron en la granja de origen, podría explicar estos resultados.

El efecto de la edad de sacrificio en la composición de la grasa subcutánea fue menos acusado que sobre la grasa renal (Tabla 2), donde sólo los porcentajes de C12:0 y C18:3 *n*-3 fueron significativamente menores en animales sacrificados a mayor edad. En cambio, el cebo común de 20 días redujo la saturación de la grasa en 4.5 puntos porcentuales, debido a la reducción sobre todo de C14:0 y C16:0, aumentando la monoinsaturación en 3.5 puntos y el porcentaje de PUFA en 1 punto porcentual. El mayor contenido en C18:1 *n*-9 del pienso de cebo influyó menos en la composición de la grasa subcutánea ($p < 0,1$) que en la renal ($p < 0,01$). Esto quizás se debió a que la mayor actividad enzimática de desaturación en la grasa subcutánea (Juárez *et al.*, 2008) enmascara la mayor insaturación que pudiese venir del pienso en aquellos animales que se cebaron durante 20 días, haciendo que la grasa tenga una composición más parecida a la de los animales que fueron sacrificados tras el destete.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Horcada, A., Beriain M.J., Lizaso, G., Insausti, K., Purroy Unanua, A. 2009. Efecto del sexo y del depósito graso en la composición de la grasa de los corderos de raza Rasa Aragonesa. *Agrociencia* 43: 803-813.
- Juárez, M., Horcada, A., Alcalde, M.J., Valera, M., Mullen, A.M., Molina, A. 2008. Estimation of factors influencing fatty acid profiles in light lambs. *Meat Science* 79: 203-210.
- Osorio, M.T., Zumalacárregui, J.M., Figueira, A., Mateo, J. 2007. Physicochemical properties of perirenal and omental fat from suckling lamb carcasses evaluated according to the type of milk source. *Small Ruminant Research* 72: 111-118.

Agradecimientos: Al CRIGP Ternasco de Aragón por la financiación (OTRI 2011/0210), a Pastores SC por el uso de sus instalaciones y a los miembros de la Unidad de Producción Animal por su asistencia técnica.

EFFECT OF LENGTH AT CLASSIFICATION CENTRE AND AGE AT SLAUGHTER ON THE FATTY ACID COMPOSITION IN LAMBS OF RASA ARAGONESA

ABSTRACT: Lamb production has evolved towards a more intensive system where some animals are reared in classification centres (CC) with a homogeneous management prior to slaughtering, different of that received in the farms of origin. In this work, the effect of the length at a classification centre (1 vs 20 days) and the age at slaughter (67 vs 107 days) has been assessed on the fatty acid composition of two depots [(kidney knob (KK) and subcutaneous(SC)]. On KK, the effect of length at CC was more important than the age of slaughter. Older animals showed less percentage of *n*-3 fatty acids, but 20 days at CC greatly increased the percentage of oleic acid and monounsaturated fatty acids, probably due to the higher unsaturation of the concentrate at CC. Differences were less obvious in SC tissue due to age at slaughter, but staying 20 days at CC reduced 4 points the saturation and increased significantly the monounsaturations, although in a smaller scale than in KK depot.

Keywords: Lamb, subcutaneous fat, kidney knob fat, lipid composition

Tabla 1. Composición en ácidos grasos (% del total) de la grasa renal según el tiempo en cebadero (C) y la edad de sacrificio (E).

CEB EDAD	1 día		20 días		E	F	C	F	E x C
	67 d	107 d	67 d	107 d					
n	11	10	10	11					
C12:0	0,61	0,38	0,36	0,29	*	5,91	**	7,58	NS
C14:0	8,16	6,69	5,58	5,59	NS	2,37	***	15,06	NS
C16:0	27,62	28,44	23,48	25,72	*	4,83	***	24,07	NS
C18:0	21,13	20,93	20,10	21,82	NS	1,14	NS	0,11	NS
C18:1n-9	29,93	26,43	31,45	29,10	***	31,55	**	16,21	NS
C18:2n-6	3,25	3,79	5,04	4,50	NS	0,00	***	31,47	*
C18:3n-3	0,47	0,38	0,49	0,41	***	21,62	NS	1,96	NS
SFA	60,63	59,3	53,15	56,22	NS	1,03	***	31,53	*
MUFA	34,95	35,79	40,62	38,26	NS	0,87	***	25,28	NS
PUFA	4,07	4,34	5,84	5,15	NS	0,85	***	30,67	*
PUFA/SFA	0,07	0,07	0,11	0,09	NS	1,38	***	34,89	*
n-6	3,37	3,79	5,07	4,53	NS	0,08	***	31,34	*
n-3	0,73	0,56	0,78	0,61	***	31,13	NS	2,34	NS
n-6/n-3	4,71	6,84	6,59	7,50	***	16,20	**	11,29	NS

Tabla 2. Composición en ácidos grasos (% del total) de la grasa subcutánea según el tiempo en cebadero (C) y la edad de sacrificio (E).

CEB EDAD	1 día		20 días		E	F	C	F	E x C
	67 d	107 d	67 d	107 d					
n	11	10	10	11					
C12:0	0,61	0,36	0,39	0,38	*	4,25	NS	2,47	NS
C14:0	8,60	6,61	6,12	6,31	NS	2,37	*	15,06	NS
C16:0	29,59	28,90	25,44	27,67	NS	4,83	***	24,07	NS
C18:0	12,48	12,03	10,99	11,89	NS	1,14	NS	0,01	NS
C18:1n-9	37,74	33,34	36,15	35,05	NS	31,55	NS	16,21	NS
C18:2n-6	2,92	3,55	4,63	3,80	NS	0,00	***	31,47	*
C18:3n-3	0,51	0,40	0,47	0,42	***	21,63	NS	1,96	NS
SFA	54,19	51,43	47,11	49,64	NS	1,03	**	31,53	NS
MUFA	41,12	43,54	46,61	44,94	NS	0,87	**	25,28	NS
PUFA	4,38	4,61	5,86	5,01	NS	0,85	***	30,67	*
PUFA/SFA	0,08	0,09	0,13	0,10	NS	1,38	***	34,89	*
n-6	3,23	3,79	4,86	4,08	NS	0,08	***	31,34	*
n-3	1,15	0,82	1,00	0,94	*	31,13	NS	3,34	NS
n-6/n-3	2,99	4,90	5,17	4,57	NS	16,20	NS	11,29	*

NS: no significativo; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; F: estadístico F del GLM

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CABRITOS CASTRADOS Y SACRIFICADOS A LOS 7-8 MESES DE EDAD PRODUCIDOS EN PASTOS DE MONTAÑA DE LOS PICOS DE EUROPA

Humada¹, M.J., Mateo², J., García³ F.J. y Serrano¹ E.

¹Centro de Investigación y Formación Agrarias. C/Héroes dos de mayo, 27, 39600.

Muriedas. Cantabria. mariajosehumada@cifacantabria.org; emmaserrano@cifacantabria.org

²Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León. Campus de Vegazana, 24071. León. jmato@unileon.es

³S.A.T. Liébana-Peñarrubia. Carretera General, s/n. 39584. Tama. Cantabria.

INTRODUCCIÓN

Desde el año 2010, la S.A.T. Liébana-Peñarrubia comercializa cabritos lechales ligeros (≤ 5 kg), lechales (>5 y ≤ 7 kg) y recentales (>7 y ≤ 10 kg) acogidos a la marca de calidad “Lechazos Montañas de Liébana” desarrollada dentro del proyecto piloto “Pastores de Biodiversidad” (www.pastoresdebiodiversidad.es). Esta agrupación de ganaderos también comercializa otros productos derivados del ganado menor como cabritos castrados, alimentados en pastos de montaña y sacrificados con 7-8 meses de edad. La producción de este tipo de animales es cada vez menos frecuente debido, por un lado, a la disminución del censo de cabezas de caprino y, por otro, al cambio en las pautas de consumo hacia animales más jóvenes como cabritos lechales, cuya producción era más habitual en otras zonas. La continuidad en la producción de este tipo de animales tiene interés tanto desde el punto de vista de la gestión y conservación de los recursos naturales en Picos de Europa como desde el punto de vista de la diversificación/diferenciación de la producción ganadera. Como una primera fase en la caracterización de la calidad de la carne de este tipo de animales en este trabajo se estudia el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 5 cabritos machos procedentes de una única explotación ubicada en la localidad de Bejes, en la comarca de Liébana (Cantabria) que cuenta con cabras del tronco Pirenaico conocidas en la zona como Cabra de los Picos y Cabra del País. Los cabritos nacieron en la primavera del 2012 y se castraron a los 45 días. Después de la castración permanecieron con sus madres en pastos comunales de Picos de Europa hasta el sacrificio con 7-8 meses de edad. En el momento del despiece se tomó una muestra de músculo *Longissimus thoracis* a nivel de la 12^a-13^a costilla para determinar el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular. Las muestras permanecieron congeladas a -18°C hasta la realización de los análisis. La extracción de la grasa se realizó según Folch *et al.* (1957) y la metilación de los ácidos grasos según Carrapiso *et al.* (2000). La identificación y cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó con un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard-6890 Series GC system)/masas (Hewlett Packard-5973 Inert Mass Selective Detector) equipado con una columna Supelcowax 10 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con 23 patrones (Sigma-Aldrich) y confirmación de los espectros de masas con la base de datos HP Willey 275.L Mass Spectral Library.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso medio de las canales fue de $12,8 \pm 1,35$ kg. En la Tabla 1 se muestra el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular como % del total de ácidos grasos identificados. El contenido de grasa intramuscular y el perfil de ácidos grasos se comparó con los valores publicados en el trabajo de Horcada *et al.* (2012) referidos a cabritos de raza Pirenaica, procedentes de un sistema de producción semi-extensivo, alimentados con lactancia natural y sacrificados entre los 42 y 46 días de edad con un peso medio de canal de 4,17 kg (7,73 kg de peso vivo) (Tabla 1). El valor medio del porcentaje de grasa intramuscular de los cabritos estudiados (1,71%) fue inferior al obtenido por Horcada *et al.* (2012) (2,05%) pero fue superior al obtenido por Ripoll *et al.* (2012) (1,37%) en cabritos Pirenaicos sacrificados con un peso vivo superior (11,62 kg). Coincidiendo con los resultados de Horcada *et al.* (2012), los ácidos grasos mayoritarios fueron el c9-18:1(24,6%), el 16:0 (17,4%), el 18:0 (16,6%) y el 14:0 (2,8%). Estos ácidos grasos representaron el 61,4% del total de ácidos grasos de la grasa intramuscular. Tanto el valor medio del porcentaje de ácidos grasos

saturados (AGS) (42,26%) como el valor individual de tres de los cinco cabritos estudiados fue inferior al recogido en Horcada *et al.* (2012) (43,45%). Cabe destacar que en los 5 cabritos estudiados los valores de los porcentajes de dos ácidos grasos saturados considerados colesterolemicos, el 14:0 y el 16:0 (Daley *et al.*, 2010), se encontraron por debajo de los valores obtenidos por Horcada *et al.* (2012) (4,68 y 23,35%, respectivamente). Por el contrario, los valores del porcentaje de 18:0 (considerado a pesar de ser saturado como un ácido graso con efecto neutro sobre el colesterol sanguíneo (Daley *et al.*, 2010)) fueron superiores en los 5 cabritos estudiados al valor medio obtenido por Horcada *et al.* (2012) (12,94%). Debido, fundamentalmente, al bajo porcentaje de ácido oleico, el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) fue en los cinco cabritos (valor medio de 31,14%) inferior al valor medio encontrado en el estudio de referencia (35,56%). Tanto el valor medio del porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (26,6%) como el valor individual de todos los cabritos del estudio fue superior al recogido en Horcada *et al.* (2012) (21,0%).

Debido al elevado porcentaje de ácidos grasos n-3 (superior en todos los animales del estudio al valor medio recogido en el trabajo de referencia), el valor medio del *ratio* n-6/n-3 (2,04) fue bajo. En el trabajo de Horcada *et al.* (2012) el valor medio de este índice fue de 2,57. En todos los cabritos estudiados el *ratio* n-6/n-3 se situó por debajo de 4, ajustándose a las recomendaciones del Department of Health (1994).

Respecto al *ratio* AGPI/AGS el valor medio obtenido (0,64) se situó, de acuerdo con las recomendaciones del Department of Health (1994), por encima de 0,45 (en los 5 cabritos). El valor medio del *ratio* AGPI/AGS fue superior al obtenido en los cabritos Pirenaicos del trabajo de Horcada *et al.* (2012) (0,48).

Otros dos índices, utilizados para valorar la composición en ácidos grasos desde el punto de vista de posibles efectos sobre la salud del consumidor, son el *índice de aterogenicidad* (Ulbricht y Southgate, 1991) y el contenido en *ácidos grasos deseables* (Huerta-Leidenz *et al.*, 1991).

El valor medio del *índice de aterogenicidad* (0,50) y los valores individuales de todos los cabritos estudiados se situaron muy por debajo del valor obtenido por Horcada *et al.* (2012) (0,75). Esto se debe al bajo porcentaje de 14:0 y 16:0 y al alto porcentaje de AGPI que presentaron los cabritos de Picos de Europa frente a los cabritos del estudio de referencia. El valor medio obtenido para el *índice ácidos grasos deseables* (74,34%) fue claramente superior al obtenido por Horcada *et al.* (2012) (69,49%) pese al menor porcentaje de 18:0 y AGMI obtenido en el presente trabajo. Este valor medio superior se ve reflejado por los elevados porcentajes de AGPI obtenidos en los cabritos de Picos de Europa.

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar coinciden con los obtenidos por otros autores en cuanto a que la alimentación de corderos y cabritos y de sus madres con dietas basadas en pasto mejora el perfil de ácidos grasos de la carne considerado desde el punto de vista de los posibles efectos sobre la salud del consumidor (Arousseau *et al.*, 2004; Valvo *et al.*, 2005; Bas *et al.*, 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arousseau B., Bauchart D., Calichon E., Micol D., Priolo A. 2004. Meat Sci. 66: 53-541.
- Bas P., Dahbi E., El Aich A., Morand-Fehr P., Araba A. 2005. Meat Sci. 71: 317-326.
- Carrapiso, A. I., Luisa Timón, M., Jesús Petró, M., Tejeda, J. F., & García, C. 2000. Meat Sci. 56:159-164.
- Daley C.A., Abbott A., Doyle P., Nader G.A., Larson S. 2010. Nut. J. 9:10.
- Department of Health, 1994.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. 1957. J. Biol. Chem. 226:497-509.
- Horcada, A., Ripoll, G., Alcalde, M. J., Sañudo, C., Teixeira, A., & Panea, B. 2012. Meat Sci. 92:89-96.
- Huerta-Leidenz, N., Cross, H., Lunt, D., Pelton, L., Savell, J., Smith, S. 1991. J. Anim. Sci. 69:3665-3672.
- Ripoll, G., Alcalde, M. J., Horcada, A., Campo, M. M., Sañudo, C., Teixeira, A., & Panea, B. 2012. Meat Sci. 92:62-70.
- Ulbricht, T., & Southgate, D. 1991. Lancet. 338:985-992.
- Valvo M.A., Lanza M., Bella M., Fasone V., Scerra M., Biondi L., Priolo A. 2005. 81: 431-436.

Agradecimientos: Grupo Deluz de restauración, S.A.T. Liébana-Peñarrubia y Fundación para la Conservación del Quebrantahuesos. Laboratorio del CIFA. Programa Doc-INIA 2008 (E. Serrano).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular (% del total de ácidos grasos identificados) de los cabritos castrados sacrificados con 7-8 meses.

	Media n = 5	σ	C.V.	Horcada <i>et al.</i> (2012)	< al valor medio de referencia	> al valor medio de referencia
Grasa intramuscular (%)	1,71	0,482	28,19	2,05	3	2
14:0	2,79	0,988	35,46	4,68	5	0
16:0	17,38	0,456	2,63	23,35	5	0
18:0	16,60	2,168	13,06	12,94	0	5
c9-18:1	24,58	2,212	9,00	30,84	5	0
18:2 n-6	10,55	1,119	10,61	8,44	0	5
18:3 n-3	2,93	0,395	13,49	1,21	0	5
c9,11-18:2	0,32	0,107	33,31	0,61	5	0
20:4 n-6	5,99	1,662	27,76	4,50	1	4
20:5 n-3	2,37	0,494	20,82	1,30	0	5
22:5 n-3	2,46	0,441	17,90	2,06	1	4
n-6	17,01	2,688	15,80	14,41	1	4
n-3	8,32	0,975	11,71	5,71	0	5
n-6/n-3	2,04	0,121	5,92	2,57	5	0
AGS ¹	42,26	2,743	6,49	43,45	3	2
AGMI ²	31,14	2,596	8,33	35,56	5	0
AGPI ³	26,60	3,512	13,20	20,99	0	5
AGPI/AGS	0,64	0,118	18,56	0,48	0	5
Índice de aterogenicidad ⁴	0,50	0,084	16,65	0,75	5	0
Ácidos grasos deseables ⁵	74,34	1,379	1,85	69,49	0	5

¹AGS: Ácidos grasos saturados; ²AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; ³AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; ⁴Índice de aterogenicidad: $(12:0+14:0 \times 4 + 16:0)/(AGMI + AGPI)$; ⁵Ácidos grasos deseables: C18:0+ AGMI + AGPI.

INTRAMUSCULAR FATTY ACID PROFILE FROM CASTRATED KIDS SLAUGHTERED AT 7-8 MONTHS PASTURE FED AT PICOS DE EUROPA MOUNTAIN

ABSTRACT: Fatty acid profile from five castrated kids was studied. Kids were kept with their mothers and pasture fed at Picos de Europa until 7-8 months (12,8 kg average carcass weight). *Longissimus thoracis* samples between 12th and 13th rib were used. Fatty acids were identified and quantified by gas chromatography/mass spectrometry. Fatty acid profile showed low percentages of saturated fatty acids and low values of the ratio n-6/n-3 and the atherogenic index. Besides, fatty acid profile displayed high percentages of polyunsaturated fatty acids (especially n-3) and high values of the desirable fatty acids index and the polyunsaturated/saturated fatty acid ratio.

Keywords: mountain pasture, castrated kids, fatty acids

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CORDEROS LECHALES DE LA MARCA DE CALIDAD “LECHAZOS MONTAÑAS DE LIÉBANA”

Humada¹, M.J., Mateo², J., García³ F.J. y Serrano¹ E.

¹CIFA, Gobierno de Cantabria. C/Héroes dos de Mayo, 27, 39600. Muriedas. Cantabria. mariajosehumada@cifacantabria.org; emmaserrano@cifacantabria.org

²Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León. Campus de Vegazana, 24071. León. jmato@unileon.es

³S.A.T. Liébana-Peñarrubia. Carretera General, s/n. 39584. Tama. Cantabria.

INTRODUCCIÓN

La marca de calidad “*Lechazos Montañas de Liébana*” forma parte del proyecto piloto “Pastores de Biodiversidad” en cuyo desarrollo participan ganaderos (S.A.T. Liébana-Peñarrubia) y hosteleros de la comarca de Liébana (Cantabria), así como la Fundación para la Conservación del Quebrantahuesos. Bajo esta marca se comercializan corderos y cabritos lechales y corderos recientes procedentes de rebaños de la comarca de Liébana (Cantabria) que cumplen el pliego de condiciones del etiquetado facultativo aprobado por el Gobierno de Cantabria el 27 de julio de 2010. Una de las particularidades de este etiquetado es que las ovejas tienen que pastar al menos dos meses al año en pastos comunales de Picos de Europa. En 2011 se comercializaron unos 800 lechazos de cordero, 200 de cabrito y 200 corderos recientes procedentes de 15 productores (Datos de la S.A.T. Liébana-Peñarrubia). Es bien conocido que el contenido y la calidad de la grasa intramuscular puede variar con la raza, alimentación, peso, edad, etc. de los corderos (Wood *et al.*, 2003). El presente trabajo tiene por objeto caracterizar el perfil de los ácidos grasos de los corderos lechales incluidos en la marca de calidad “*Lechazos Montañas de Liébana*”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 21 corderos lechales machos de raza Lacha cara negra en pureza y procedentes del cruce entre ovejas de esta raza con machos cárnicos. Los corderos utilizados procedían de 8 explotaciones y se alimentaron exclusivamente con leche materna. El sistema de manejo general de las madres consiste en que éstas permanecen en pastoreo durante todo el año excepto desde el parto hasta la venta del cordero (35 días aprox.). Durante este periodo de amamantamiento del cordero las ovejas se estabulan y reciben un forraje conservado y alimento concentrado. Los corderos utilizados se sacrificaron durante los meses de febrero y marzo con un peso de canal medio de $6,74 \pm 0,28$ kg. Desde el sacrificio hasta la toma de muestras, las canales permanecieron congeladas en una instalación de congelación comercial. Una vez descongeladas las canales, se extrajo el músculo *Longissimus thoracis* a nivel de la 12^a-13^a costilla para determinar el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular. La extracción de la grasa se realizó según Folch *et al.* (1957) y la metilación de los ácidos grasos según Carrapiso *et al.* (2000). La identificación y cuantificación de los ésteres metílicos se realizó con un cromatógrafo HP-6890 Serie GC/HP-5973 Mass Selective Detector con una columna Supelcowax10 (30mx0,25mmx0,25µm). La identificación de los ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención con 23 patrones (Sigma-Aldrich) y confirmación de los espectros de masas de la base de datos HPWilley 275L. Los valores obtenidos se compararon con valores medios de referencia utilizando la prueba T para una muestra del programa SPSS v.17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A diferencia de animales de más edad en los que el rumen ya es funcional, en los lechazos el perfil de ácidos grasos de la grasa depositada depende fundamentalmente del perfil de ácidos grasos de los alimentos, en este caso leche materna (Manso *et al.*, 2011). A su vez, el principal factor que determina la composición en ácidos grasos de la leche de las ovejas es la dieta. La Tabla 1 muestra el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular de los lechazos estudiados (% del total de ácidos grasos identificados). El contenido medio de grasa intramuscular (2,28%) fue superior al obtenido por Miguélez *et al.* (2008) en lechazos de la IGP “Lechazo de Castilla y León” (1,99%) alimentados con leche materna e inferior al obtenido por Velasco *et al.* (2001) en lechazos de raza Talaverana (3,61%) con un peso de canal de 7,27 kg, alimentados también exclusivamente con leche materna.

El perfil de ácidos grasos de los corderos “Lechazos Montañas de Liébana” se comparó con los perfiles obtenidos en los trabajos de Manso *et al.* (2011) y Osorio *et al.* (2007) (Tabla 1). En el primer trabajo se estudiaron lechazos de raza Churra cuyas madres habían recibido una dieta enriquecida con aceite de semillas de lino con el objetivo de mejorar el perfil de ácidos grasos de los corderos. En el trabajo de Osorio *et al.* (2007), se estudian lechazos de raza Churra producidos en explotaciones comerciales, alimentados con lactancia natural y comercializados dentro de la IGP Lechazo de Castilla y León. Coincidiendo con los resultados de Osorio *et al.* (2007) y Manso *et al.* (2011), los ácidos grasos mayoritarios fueron, en este orden: c9-18:1(23,9%), 16:0 (18,3%), 18:0 (12,6%) y 14:0 (5,7%). Esta composición refleja el perfil de ácidos grasos de la leche de oveja, rica en ácidos grasos saturados (AGS) de cadena corta (4:0 al 11:0) y media (12:0 al 14:0), y en 16:0 y 18:0. El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (25,2%) fue superior ($p<0,05$) al valor medio recogido en Osorio *et al.* (2007) (19,7%) (20 de los 21 corderos presentaron valores superiores) e inferior ($p<0,05$), pero relativamente cercano, al obtenido por Manso *et al.* (2011) (26,9%) (14 de los 21 corderos presentaron valores inferiores). Como consecuencia, fundamentalmente, del alto porcentaje de ácidos grasos n-3 (los valores individuales de todos los corderos fueron superiores a los valores medios de los dos trabajos de referencia), el valor medio del *ratio* n-6/n-3 (2,99) fue inferior ($p<0,05$) a los obtenidos en los trabajos de Manso *et al.* (2011) y Osorio *et al.* (2007) (6,31 y 5,23, respectivamente). Concretamente, en 18 de los 21 lechazos estudiados se situó por debajo de 4 según las recomendaciones del Department of Health, 1994. Las otras tres muestras se encontraron por debajo de 4,9. Respecto al *ratio* AGPI/AGS el valor medio obtenido (0,59) se situó, de acuerdo con las recomendaciones del Department of Health (1994), por encima de 0,45 (en 20 de los 21 corderos el valor fue superior a 0,45). El valor medio del *ratio* AGPI/AGS fue superior ($p<0,05$) al obtenido en los corderos churros comerciales del trabajo de Osorio *et al.* (2007) (0,49) e inferior ($p<0,05$) al obtenido por Manso *et al.* (2011) (0,68), aunque no hay que olvidar que se trataba de un ensayo en el que se suministraba a las madres una dieta enriquecida con aceite de semillas de lino.

Otro índice, menos empleado, es el *índice de aterogenicidad* que valora el perfil de ácidos grasos desde el punto de vista de posibles efectos sobre la salud cardiovascular. El valor medio de este índice (0,75) fue similar al obtenido por Manso *et al.* (2011) (0,71) en los corderos del lote control cuyas madres no recibían una dieta enriquecida en AGPI. Aunque el porcentaje de AGPI de los corderos “Lechazos Montañas de Liébana”, fundamentalmente n-3, fue relativamente alto, el porcentaje de AGS (43,0%) también fue elevado mientras que el de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (31,8%) fue relativamente bajo. El porcentaje de AGS fue superior al valor medio obtenido por Osorio *et al.* (2007) (40,5%) en 15 de los 21 corderos y por Manso *et al.* (2011) en 19. Por el contrario, el porcentaje de AGMI (31,8%) fue inferior ($p<0,05$) al descrito en los dos trabajos de comparación y solo 6 de los 21 corderos superaron el valor medio obtenido por Manso *et al.* (2011) (33,8%) y ninguno el obtenido por Osorio *et al.* (2007) (39,9%). El valor obtenido para el *índice ácidos grasos deseables* refleja el menor porcentaje de ácido esteárico (AGS caracterizado por su impacto neutro sobre el colesterol sanguíneo) y de AGMI, principalmente de oleico. El porcentaje de 18:0 de 11 de los 21 lechazos estudiados se situó por debajo del valor medio (12,5%) de los lechazos de la IGP Lechazo de Castilla y León ($p>0,05$). La cifra se eleva a 17 cuando se comparan con los resultados de Manso *et al.* (2011) ($p<0,05$). El consumo de ácido oleico se asocia a una reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Carrero, 2005). Los valores individuales de oleico de los 21 corderos estudiados (valor medio 23,9 %) fueron inferiores a los valores medios recogidos en Manso *et al.* (2011) (28,8%) y Osorio *et al.* (2007) (31,6%).

De los resultados de este estudio preliminar se podría deducir que el perfil de ácidos grasos de los corderos incluidos en la marca de calidad “Lechazos Montañas de Liébana” presentaría similitudes y diferencias con los obtenidos en los dos trabajos con los que se compara. Las similitudes podrían derivarse de que, a pesar de tratarse de un sistema de producción de carne basado en el pastoreo (potencial factor responsable de las diferencias encontradas), durante un corto periodo de tiempo las ovejas se estabulan y reciben una alimentación similar a la utilizada en sistemas de producción de leche más intensivos. Cabe destacar entre los resultados tres aspectos positivos: el porcentaje relativamente alto de AGPI de la serie n-3, el valor relativamente bajo del *ratio* n-6/n-3 y alto del *ratio* AGPI/AGS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carrapiso, A.I., Luisa Timón, M., Jesús Petró, M., Tejada, J.F., García, C. 2000. *Meat Sci.* 56:159-164. ●Carrero 2005. Tesis doctoral. ISBN: 84-338-3323-5. ●Department of Health, 1994. ●Folch J., Lees M., Sloane, G. 1957. *J. Biol. Chem.* 226:497-509. ●Huerta-Leidenz N., Cross H., Lunt D., Pelton L., Savell J., Smith S. 1991. *J. Anim. Sci.* 69:3665-3672. ●Manso, T., Bodas, R., Vieira, C., Mantecón, A.R., Castro, T. 2011. *Animal.* 5:1659-1667. ●Miguélez E., Zumalacárregui J.M., Osorio, M.T., Figueira A.C., Fonseca B., Mateo J. 2008. *Small Rum. Res.* 77:65-70. ●Osorio M.T., Zumalacárregui J.M., Figueira A., Mateo J. 2007. *Small Rum. Res.* 73:127-134. ●Ulbricht T., Southgate D. 1991. *Lancet.* 338:985-992. ●Velasco S., Cañeque V., Pérez C., Lauzurica S., Díaz M.T., Huidobro F., Manzanares C., González J. 2001. *Meat Sci.* 59:325-333. ●Wood J.D., Richardson R.I., Nute G.R., Fisher A.V., Campo M.M., Kasapidou E., Sheard P.R., Enser M. 2003. *Meat Sci.* 66:21-32.

Agradecimientos: Fundación para la Conservación del Quebrantahuesos y S.A.T. Liébana-Peñarrubia. Laboratorio Agrícola del CIFA. Programa Doc-INIA 2008 (E. Serrano).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular (% del total de ácidos grasos) de los corderos “Lechazos Montañas de Liébana”, valores medios de los trabajos de referencia y significación estadística de la comparación de dichos valores con los obtenidos en los “Lechazos Montañas de Liébana”.

			Manso <i>et al.</i> , 2011		Osorio <i>et al.</i> , 2007	
	Media	σ	Media	Sig.	Media	Sig.
Grasa Intramuscular (%)	2,28	0,376	-	-	-	-
14:0 (mirístico)	5,71	1,196	4,69	0,001	4,74	0,001
16:0 (palmitico)	18,34	1,530	19,4	0,005	18,1	0,478
18:0 (esteárico)	12,57	1,077	13,28	0,007	12,53	0,879
c9-18:1 (oleico)	23,90	2,186	28,77	0,000	31,57	0,000
18:2 n-6 (linoleico)	11,11	1,454	11,86	0,029	8,44	0,000
18:3 n-3 (linolénico)	1,95	0,666	2,11	0,286	1,30	0,000
c9,11-18:2 (ruménico)	0,68	0,255	1,13	0,000	0,51	0,007
20:4 n-6	4,98	1,193	7,63	0,000	4,86	0,646
20:5 n-3 (EPA)	1,57	0,501	1,38	0,096	1,44	0,246
22:5 n-3 (DPA)	1,94	0,442	-	-	-	-
n-6 (omega-6)	16,68	2,524	19,78	0,000	14,36	0,000
n-3 (omega-3)	5,95	1,536	3,49	0,000	3,09	0,000
n-6/n-3	2,99	0,917	6,31	0,000	5,23	0,000
Saturados	43,03	2,832	39,37	0,000	40,47	0,000
Monoinsaturados	31,78	2,346	33,78	0,001	39,90	0,000
Polinsaturados	25,18	2,967	26,85	0,018	19,65	0,000
Polinsaturados/Saturados	0,59	0,099	0,68	0,000	0,49	0,000
Índice de aterogenicidad ¹	0,75	0,147	0,64	0,003	-	-
Ácidos grasos deseables ²	69,53	3,252	73,91	0,000	72,08	0,002

¹Índice de aterogenicidad (Ulbricht y Southgate (1991)): $(12:0+14:0 \times 4 + 16:0)/(\text{monoinsaturados} + \text{poliinsaturados})$. ²Ác. grasos deseables (Huerta-Leidenz *et al.*, 1991): C18:0+ monoinsaturados + poliinsaturados.

FATTY ACID PROFILE FROM INTRAMUSCULAR FAT OF SUCKLING LAMBS INCLUDED IN THE QUALITY LABEL “LECHAZOS MONTAÑAS DE LIÉBANA”

ABSTRACT: Fatty acid profile from twenty-one suckling lambs included in the quality label “Lechazos Montañas de Liébana” was studied. Suckling lambs were kept with their mothers and fed exclusively maternal milk until 35 days (6,74 kg carcass). During milking grazing ewes were fed conserved forage and concentrate indoors. *Longissimus thoracis* samples were used. Fatty acid was identified/quantified by gas chromatography/mass spectrometry. Fatty acid profile showed relatively high % of saturated, polyunsaturated and n-3 fatty acids and relatively low % of monounsaturated fatty acids. Polyunsaturated/saturated fatty acid ratio average value was higher than 0,45 and the n-6/n-3 fatty acid ratio average value was lower than 4, fitting international recommendations of health authorities.

Keywords: suckling lambs, quality label, fatty acid

CONTENIDO EN MINERALES Y RELACIÓN Fe/Zn EN CARNE DE CABRITO DE RAZA BRAVIA EN MODO DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICO Y EFECTOS NUTRICIONALES

Pires, P.¹, Vilarinho, M.¹, Barros, M.¹, Fernandes, E.¹, y Araújo, J.P.²

¹Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Av. do Atlântico, 4990-706 Viana do Castelo, Portugal. Email: ppires@estg.ipvc.pt

²Centro de Investigação da Montanha (CIMO), Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viana do Castelo

INTRODUCCIÓN

Los minerales son una clase de componentes de los alimentos con un impacto en la salud humana, siendo la carne una fuente importante de metales mayores y traza y contribuye en gran medida a la ingesta diaria de estos nutrientes en la dieta (OMS, 1996). Sin embargo, algunas enfermedades crónicas debido a deficiente ingesta de oligoelementos es una realidad (Lombardi *et al.*, 2003). La deficiencia de zinc es reconocido como un importante problema de nutrición humana en todo el mundo. Se ha estimado que afecta hasta un tercio de la población mundial. La carne es una fuente rica de Zn biodisponible en comparación con los cereales y otras fuentes vegetales. Sin embargo hay una inhibición dependiente de la dosis de la absorción de zinc por hierro que depende de la relación entre Fe y Zn. El contenido mineral de la carne no es constante, sino que está influenciado por una serie de factores tales como la edad, el estado nutricional del animal, y los factores medioambientales y genéticos. Hay una gran variabilidad en los metales traza en la carne de caprinos en diferentes estudios. Los objetivos de este trabajo fueron: (i) evaluar el contenido de algunos minerales importantes como el calcio, fósforo, magnesio, potasio y sodio, y algunos elementos traza como el cobre, zinc, hierro y manganeso, y la relación Fe/Zn en la carne de cabritos de la raza Bravia en Terras de Bouro, Portugal, (ii) comparar los resultados de nuestro estudio con los niveles en otros estudios de la carne de cabrito.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado doce cabritos machos y ocho hembras de raza Bravia provenientes de dos explotaciones en modo de producción ecológico ubicadas en el municipio de Terras de Bouro, en el noroeste de Portugal. Estas granjas son muy representativas del territorio, ya que tradicionalmente se dedican a la cría de cabritos. La alimentación de los cabritos consistía en leche suministrada antes de la salida de las cabras y después de su regreso de los pastos de montaña. Durante el día, los cabritos tenían heno disponible, granos de maíz y agua. Los cabritos fueron destetados y sacrificados con el peso vivo de $8,4 \pm 0,9$ kg (machos) y $8,1 \pm 1,4$ kg (hembras), que se produjo en torno a la edad de 11-14 semanas. El Ca, Mg, K, Na, Cu, Zn, Fe y Mn se determinaron mediante el uso de un espectrofotómetro de absorción atómica (AA) VARIAN modelo Spectra 300 (VARIAN Inc., Palo Alto, USA) equipado con lámparas de cátodo hueco (S & Juniper & Co. - 7 Potter St. Harlow, Essex, CM17 9AD, Inglaterra) para el Ca, Mg, Fe y Mn y lámparas de cátodo hueco Photron (Photron, SA - Unidad 3.5 Drive Vesper - Narre Warren 3805 - VICTORIA, AUSTRALIA) para el K, Na, Cu y Zn. Antes del análisis, las muestras se sometieron a un proceso de mineralización seco, 3,5 g de muestra ha sido oxidada a 550°C. Para estas determinaciones, las cenizas de la carne se disolvieron en 3 ml de HNO₃ concentrado y se diluyó a 50,0 ml con agua desionizada. La concentración de P se determinó por absorción molecular (Hitachi modelo U - 1100). Para el análisis convencional, el contenido de humedad se obtuvo midiendo la diferencia de peso antes y después del calentamiento en estufa durante 3 horas a 103°C hasta el peso constante y el color medido en un Chroma Meter CR 300 - Minolta. Los pigmentos (540 nm) se siguieron los métodos modificados por BOCCARD *et al.* (1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de metales (Ca, P, Mg, K, Na, Cu, Zn y Fe) en el músculo de los cabritos. El Mn no se incluyó en la tabla, ya que, en todas las muestras analizadas, el valor era inferior al límite de detección (0,64 mg/100g) de la AA. Los minerales

como el zinc, el cobre y el hierro juega un papel relevante en la defensa celular contra el estrés oxidativo, y están presentes en muchas enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutase y glutatión peroxidase (Marino *et al.*, 2011). La carne de raza Bravia presenta 14,5, 1,4 y 5,6 veces más Cu, Zn y Fe que los niveles correspondientes de estos metales traza en la carne del cabrito Garganica con peso similar (Longobardi *et al.*, 2012). En la raza Bravia los niveles de Cu y Zn, non han sido diferentes entre los géneros, mientras que la carne de las hembras contenía 1,2 veces más de Fe que la masculina ($p < 0.001$). Las principales concentraciones de Na, P y Mg han variado con el sexo. Hay una influencia de los niveles de hierro en la absorción de zinc en humanos (Marino *et al.*, 2011). Las interacciones zinc-hierro dependen de su relación, y entre 2:1 y 5:1 se produce una inhibición dependiente de la dosis de la absorción del zinc. Carne de cabrito de la raza Bravia aporta aproximadamente el 30-40% de la ingesta diaria recomendada de zinc, que es de 8 y 11 mg/día para mujeres y los hombres con 18-50 años de edad (Institute of Medicine, 2001). La Tabla 2 muestra los pigmentos de la carne y los parámetros de color. La carne es de color rosa pálido con reducido a^* (índice de rojo), alto L^* (luminosidad) y una reducida concentración de pigmentos que se hace referencia en la literatura (V. Santos *et al.*, 2007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Longobardi, F., Sacco, D., Casiello, G., Ventrella, A., Contessa, A., Sacco, A. 2012. J. Food Comp. Anal. 28: 107–113.
- Institute of Medicine. 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, DC, USA: National Academy Press.
- Lombardi-Boccia, G., Aguzzi, A., Cappelloni, M., Di Lullo, G. & Lucarini, M. 2003. Total-diet study: dietary intakes of macro elements and trace elements in Italy. British J. Nutr., 90: 1117–1121.
- Marino, M., Masella, R., Bulzomi, P., Campesi, I., Malorni, W., Franconi, F. 2011. Molecular Aspects of Medicine 32: 1–70.
- Tshabalalaa, P. A., Strydomb, P. E., Webbc, E. C., Kock, H. L. 2003. Meat Sci. 65 Issue 1: 563-570.
- Santos, V. A. C., Silva, S. R., Mena, E. G., Azevedo J. M. T. 2007. Meat Sci. 77: 654–661.
- World Health Organization (WHO) (1996). Trace elements in human health and nutrition. Geneva: WHO Publications.
- Young W. Park, Trace mineral contents and FeZn ratio in goat meat. 1988. J. Food Comp. Anal. 1, Issue 3: 283-289.

Tabla 1. Contenido en minerales (mg/100g) de *longissimus lumborum* de cabritos de raza Bravia.

Minerales (mg/100g)	Machos (n=12)				Hembras (n=8)				Sig.
	Med. ±DT	Min.	Max.	CV(%)	Med. ±DT	Min.	Max.	CV(%)	
Ca	7,55±1,69	4,91	9,82	22,4	8,21±2,04	6,24	11,58	24,8	NS
P	199,4±10,8	179,5	218,4	5,39	209,2±5,26	199,8	214,0	2,51	*
Mg	23,37±1,43	20,91	25,17	6,13	26,22±1,10	25,01	28,40	4,19	***
K	401,8±30,7	336,9	445,6	7,63	420,7±12,1	401,7	442,0	2,89	NS
Na	194,0±16,5	171,6	226,8	8,48	171,3±18,9	143,6	206,9	11,1	*
Cu	0,22±0,06	0,14	0,35	27,1	0,25±0,06	0,18	0,37	24,2	NS
Zn	3,33±0,32	2,70	3,86	9,62	3,05±0,28	2,50	3,33	9,31	NS
Fe	0,88±0,10	0,71	1,01	11,6	1,06±0,08	0,94	1,19	7,13	***
Fe/Zn ratio	0,27±0,04	0,20	0,37	16,7	0,35±0,03	0,32	0,40	7,67	***
Humedad (%)	75,96±1,30	73,95	77,91	1,71	75,89±1,25	73,73	77,08	1,64	NS

Sig: Nivel de significación *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; NS No significativo.

Tabla 2. Pigmentos y parámetros de color en *longissimus lumborum* de cabritos de raza Bravia.

	Machos (n=12)				Hembras				Sig.
	Med. ±DT	Min.	Max.	CV(%)	Med. ±DT	Min.	Max.	CV(%)	
pigmentos									
(mg/g)	0,67±0,16	0,34	0,88	24,3	0,70±0,19	0,45	1,05	26,9	NS
L*	52,85±2,46	49,16	56,58	4,65	49,75±2,16	45,95	51,98	4,34	**
a*	13,32±1,85	10,46	15,75	13,9	15,69±1,73	13,10	18,19	11,0	**
b*	3,00±1,10	1,61	5,63	36,7	3,79±1,03	2,78	5,51	27,2	NS
C*	13,68±1,93	10,58	16,04	14,1	16,17±1,80	13,45	18,58	11,1	**
hab	12,63±3,87	8,52	21,50	30,7	13,56±3,13	10,07	18,39	23,1	NS

Sig: Nivel de significación *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05; NS No significativo.

MINERALS CONTENT AND Fe/Zn RATIO IN BRAVIA KID GOAT MEAT AND NUTRITIONAL IMPACTS

ABSTRACT: The concentrations of major metals, calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg), potassium (K), sodium (Na), and trace metals, copper (Cu), zinc (Zn), iron (Fe), manganese (Mn), and Fe/Zn ratio in *longissimus lumborum* muscle from Bravia kid goat breed were determined by atomic absorption spectroscopy to compare differences in concentrations of these elements among sexes and to investigate correlations among the parameters. Pigment concentration and colour parameters were also evaluated and analysed with metals concentration. The levels of Ca, K, Cu and Zn, were not different between gender, while that of P and Na were significant ($p < 0.01$) and that of Mg and Fe ($p < 0.001$). Female contained 1.3 times greater Fe/Zn ratio than male. There were high correlations among the mineral contents, especially between P and Mg ($p < 0.001$), P and K ($p < 0.01$), Mg and K ($p < 0.01$). There were also high correlations between Fe and a* (redness) and Fe and pigments ($p < 0.05$). The most interesting findings of this work, for their impact on human nutrition and health, were represented by a high concentration in trace metals specially Cu, Zn and Fe and a good Fe/Zn average ratio (0.30), that make the Bravia kid goat meat a highly appreciable food product.

Keywords: Bravia, kid, goat meat, metal content.

CARACTERES MORFOLÓGICOS, PRODUCTIVOS Y DE BIENESTAR EN OVEJAS DE RAZA CHAMARITA

Pascual-Alonso, M.* , Miranda-de la Lama, G.C., Aguayo-Ulloa, A., J.L. Olleta, C. Sañudo y María, G.A.

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, E-mail: mpascual@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España incluye a la oveja Chamarita en el grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción. Esta raza autóctona de la Comunidad Autónoma de La Rioja cuenta con dos Asociaciones de Ganaderos: AROCHA y PROCORCHA. Fue reconocida como marca de calidad en abril de 2010 (13 explotaciones con un total de aproximadamente 10000 ovejas). La mayoría de las cabezas se localizan en La Rioja Baja (Valles de Cidacos y Linares). Agrupa animales de porte pequeño, muy adaptadas al duro medio serrano en que viven, a su sistema de manejo y alimentación. Los rebaños muestran una elevada diversidad morfológica con capas blancas y royas. Es de destacar su rusticidad y su capacidad de adaptación al medio y su aptitud maternal. El producto principal del sistema de producción es el lechazo que sale al mercado con menos de 13,5 kilos de peso vivo y un máximo de 40 días de vida. Su alimentación es casi exclusivamente de leche materna. El estudio describe los caracteres morfológicos, productivos, de bienestar animal y de comportamiento social de ovejas de raza Chamarita. Se analiza la influencia del color de capa de la oveja sobre estas variables. Se estudia la calidad de la canal y la carne de corderos en su versión clásica tipo lechazo y como ternasco ligero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos de este estudio fueron obtenidos de un rebaño experimental de 50 ovejas Chamaritas y un total de 45 corderos nacidos de las mismas. Además del peso, se tomaron las siguientes medidas morfológicas de cada oveja: la distancia del pecho a la cola; la altura a la cruz y el diámetro torácico. Se tomaron de cada oveja dos muestras de sangre (con y sin anticoagulante). Se evaluaron las variables asociadas a la respuesta de estrés. El comportamiento se estudió mediante observaciones directas durante un total de 96 horas para registrar el comportamiento social (interacciones agonísticas y no agonísticas o afiliativas). Se realizaron pruebas cognitivas utilizando un laberinto T. Se cubrieron las ovejas por monta natural controlada. Los corderos fueron mantenidos juntos en un mismo corral con sus madres (2m²/oveja y cordero). Se registró la prolificidad del rebaño como número total de corderos nacidos entre el total de ovejas paridas. Se analizaron los pesos al nacimiento (PN) y al destete (PD), y se estimó el crecimiento medio diario (CMD) para el periodo de lactancia (30 días). Se seleccionó un total de 20 corderos para estudiar la calidad de la canal y la carne. Diez de ellos fueron sacrificados dentro del rango de peso correspondiente a la categoría lechal, y otros diez fueron sacrificados dentro del rango de peso de la categoría Ternasco ligero (30 días de cebo). Veinticuatro horas post-sacrificio se registraron el peso de la canal fría, la conformación, el engrasamiento, el grado de contusiones y el pH. La espalda izquierda fue separada y se diseccionó en sus componentes. Se utilizó el M. *longissimus* para evaluar color, pérdidas por cocinado y textura por Warner-Bratzler. Los datos fueron analizados utilizando técnicas de mínimos cuadrados con el procedimiento GLM de SAS (1998). Una probabilidad de valor de P<0,05 fue considerada estadísticamente significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medidas morfológicas indican una oveja de tamaño pequeño que concuerda con las características de la mayoría de las razas ovinas autóctonas consideradas rústicas. Esta adaptación les permite ser más eficientes en el aprovechamiento de los recursos a su alcance, rentabilizando y preservando el medio en el que viven. Nuestras ovejas presentaron mayor peso vivo de media y mayor alzada a la cruz que las descritas por Barrio *et al.* (1991), quizá como consecuencia de la buena alimentación de nuestro rebaño experimental. Todas las medidas fisiológicas estudiadas se encuentran dentro del rango normal descrito para ovinos como respuesta a un manejo rutinario (Hargreaves y Hutson,

1990). El color de la capa sólo afectó los niveles de glucosa siendo los niveles de las ovejas blancas superiores en un 31,1% a las royas. Esto probablemente se deba a un mayor consumo ya que también presentan una tendencia a ser más pesadas y a ser las más dominantes del rebaño. Ello se deduce de la observación de interacciones sociales, con un mayor nivel de agresiones emitidos por las ovejas blancas que por ovejas royas (+71,5%). Todas las ovejas fueron capaces de resolver el desafío cognitivo, indicando que las diferencias en color de capa no implican diferencias en la respuesta de estrés entre animales ni en su rendimiento cognitivo. La prolificidad media del rebaño fue de 1,29 ($\pm 0,36$) corderos/oveja y parto. Doménech *et al.*, (1992) destacan una tendencia a los partos simples debido a la escasez del medio, pero apuntan que un aporte alimenticio superior podía elevar la prolificidad en rebaños bien nutridos. Esto demuestra un elevado potencial de la raza en este sentido. Los corderos pesaron al nacimiento más de lo comunicado para la raza, siendo significativamente más pesados los corderos nacidos de madres blancas que los de madres royas (+9%). También presentaron mayor CMD (+14,7%) probablemente debido a la diferente producción e ingestión de leche y al estatus social de la madre dentro del grupo social. La conformación y el engrasamiento de las canales estuvieron dentro de rangos comercialmente aceptables, siendo semejantes a los indicados para lechazos de Castilla y León (Sánchez *et al.*, 1998). Se encontraron diferencias significativas en el pH a las 24h *post mortem*, siendo significativamente superior en los corderos tipo ternasco (+3%). Se ha observado una ligera tendencia a un incremento del pH con la edad del animal (Sañudo *et al.*, 1996), probablemente debido a una mayor susceptibilidad al estrés (Devine *et al.*, 1993). En nuestro estudio, la disección de la espalda de cada una de las canales no mostró diferencias en porcentajes de músculo, grasa total, grasa subcutánea ni grasa intermuscular, sin embargo, la proporción de hueso en la espalda fue significativamente mayor en los corderos cebados (+11,7%), al igual que la proporción de desechos (+43,2%). El color también resultó significativamente diferente entre diferentes tipos de canales. Los valores de luminosidad (L*) fueron superiores en lechales (+9%); los de rojo (a*) mayores en ternascos (+10,4%) y los de Hue* fueron superior en un 24,2% en lechales. Las variables de color generalmente se ven afectadas por el peso de la canal debido al acúmulo de pigmentos (Sañudo *et al.*, 1996). Una dieta basada exclusivamente en leche materna produce carne más pálida con menos pigmentos (Field *et al.*, 1990; Sañudo *et al.* 1998). Las pérdidas por cocinado fueron superiores en los corderos lechales (+35%). En conclusión, aunque la oveja Chamarita es una raza que no puede competir con las razas mejoradas modernas en producción cuantitativa, resulta rentable en sistemas de producción extensivos aprovechando recursos del medio que de otra manera no serían aprovechados. Su integración en un agro-ecosistema sostenible con escasos *inputs* externos dan al producto una calidad diferenciada apta de consumo cercano en la tendencia *slowfood*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrio AR, Falceto MD, Doménech JM. 1991. XVI Jornadas Científicas de la S.E.O.C.
- Devine CE, Grafhuis AE, Muir PD, Chrystall BB. 1993. *Meat Sci.* 35: 63-77.
- Doménech JM, Barrio AR, Falceto MD, González Jiménez JÁ. 1992. La oveja Chamarita. Serie Estudios nº 25, Gobierno de La Rioja. Logroño, La Rioja, España.
- Field RA, Maiorano G, McCormick RJ, Riley ML, Russell WC, Williams FL, Crouse JD. 1990. *J. Anim. Sci.* 68: 1616-1623.
- Hargreaves AL, Hutson GD. 1990. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 26: 243–252.
- Sánchez A, Alfonso M, Sañudo C, Pardos JJ, Delfa R, Sierra I, Fisher A. 1998. *Producción Ovina y Caprina* 23: 133-137.
- Sañudo C, Santolaria MP, María G, Osorio M, Sierra I. 1996. *Meat Sci.* 42: 195–202.
- Sañudo C, Sánchez A, Alfonso M. 1998. *Meat Sci.* 49: S29-S64.

Agradecimientos: El estudio fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (proyecto AGL-2009-10794/GAN). Gracias en especial a las asociaciones AROCHA y PROCORCHA por su apoyo e interés en el proyecto. Gracias al personal del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (SAEA). Muchas gracias a la Comunidad Autónoma de La Rioja por la beca predoctoral de M. Pascual-Alonso (Programa de Ayudas Predoctorales del Gobierno de La Rioja).

Tabla 1. Medias (\pm DE) de los parámetros morfológicos, de bienestar y productivos de las ovejas Chamaritas y efecto del tipo de cordero en los parámetros de calidad de carne.

	Conjunto	Blancas	Royas
Peso vivo (kg)	44.26 \pm 6.74	46.23 \pm 1.72	43.36 \pm 1.16
Diámetro torácico (cm)	104.05 \pm 4.58	105.18 \pm 1.11	103.47 \pm 0.79
Altura a la cruz (cm)	65.72 \pm 3.7	66.55 \pm 0.89	65.28 \pm 0.64
Longitud (cm)	72.93 \pm 4.25	73.82 \pm 1.03	72.47 \pm 0.74
Agresiones	163.88 \pm 107.03	226.12 \pm 23.78 ^a	131.82 \pm 17.06 ^b
Afiliaciones	18.74 \pm 21.55	19.58 \pm 5.28	18.3 \pm 3.79
Tiempo resolución labT (s)	59.97 \pm 71.96	65.29 \pm 12.2	56.9 \pm 9.25
Prolificidad	1.29 \pm 0.36	1.25 \pm 0.09	1.3 \pm 0.07
PN corderos (kg)	3.63 \pm 0.59	3.86 \pm 0.16 ^a	3.53 \pm 0.1 ^b
CMD corderos (g)	215.56 \pm 48.56	236.49 \pm 13.04 ^a	206.18 \pm 8.73 ^b
PD corderos (kg)	11.95 \pm 2.12	12.46 \pm 0.59	11.72 \pm 0.39
<i>Calidad de la carne</i>		Lechal	Cebo
Peso canal fría (kg)		4.58 \pm 0.31	6.99 \pm 0.27
Hematomas (0-3)		1.42 \pm 0.33 ^a	0.33 \pm 0.29 ^b
Conformación		2.16 \pm 0.25	2.2 \pm 0.22
Engrasamiento		3.02 \pm 0.46	1.82 \pm 0.4
pH 24 horas		5.56 \pm 0.02 ^a	5.73 \pm 0.02 ^b
Músculo (%)		57.59 \pm 1.69	54.45 \pm 1.69
Grasa total (%)		14.83 \pm 1.88	14.15 \pm 1.88
Grasa subcutánea (%)		6.19 \pm 1.2	5.62 \pm 1.2
Grasa intermuscular (%)		5.29 \pm 0.53	5.32 \pm 0.53
Hueso (%)		19.86 \pm 0.65 ^a	22.19 \pm 0.65 ^b
Desechos (%)		4.47 \pm 0.42 ^a	6.4 \pm 0.42 ^b
Pérdidas por cocinado (g)		5.79 \pm 0.36 ^a	4.29 \pm 0.36 ^b
L		47.82 \pm .98 ^a	43.86 \pm 0.98 ^b
a*		13.91 \pm 0.53 ^a	15.35 \pm 0.53 ^b
b*		5.83 \pm 0.28	5.15 \pm 0.28
Chroma*		15.11 \pm 0.55	16.19 \pm 0.55
Hue*		22.91 \pm 0.96 ^a	18.44 \pm 0.96 ^b
Máx Load (kg)		3.16 \pm 0.5	3.65 \pm 0.5
Dureza (kg/cm2)		1.23 \pm 0.33	1.85 \pm 0.32

Letras diferentes (a, b) en la misma fila denotan significación estadística (P<0.05).

THE CHAMARITA SHEEP: PRODUCTIVE, MEAT QUALITY AND WELFARE TRAITS

ABSTRACT: The aim of this study was to describe the morphological, productive and welfare traits of an experimental flock of Chamarita sheep and the effect of the coat colour on these traits. The Chamarita is an endangered native breed from La Rioja (Spain) producing a quality brand meat. We studied 50 adult ewes and 45 lamb. Ewes' weight, body length, height at withers and thorax circumference were measured. The physiological stress response was assessed in blood samples. Social behaviour was registered analysing aggressive and affiliative interactions. Each ewe was subjected to a cognitive test (T-maze). The ewes' prolificity and the birth weight (BW) average daily gain (ADG) during the milking period and weaning weight of their lambs were registered. A total of 20 lambs were selected for carcass and meat quality evaluation, 10 of them as suckling lambs and 10 fattened to *light Ternasco* type. Data were analysed using the GLM procedure of SAS. We found differences between animals of different colour in the number of aggressive interactions, and in BW and ADG of their lambs. The carcass and meat quality measurements demonstrated a product close to the quality traits of a typical sucking lamb meat.

Keywords: Chamarita sheep breed, performance, meat quality, animal welfare.

Patología animal

INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL CODON 222 DEL GEN PRNP EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA EN CABRAS

Pitarch J.L.¹, Langeveld J.², Bossers A.², Marín B.¹, Barillet F.³, Bouvier F.³, Monteón E.¹, Bolea R.¹, Monzón M.¹, Hedman C.¹, Hernández R.¹, Garza M.C.¹, Andreoletti O.⁴, Badiola J.J.¹, Acín C.¹

¹Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España; ² Central Veterinary Institute of Wageningen UR; Netherlands; ³ INRA-UR 631 SAGA Castanet-Tolosan, France and UE 332, Bourges, France; ⁴ INRA, UMR 1225 IHAP; ENV Toulouse, France. jlpitarch@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La finalidad del presente estudio es identificar el papel que determinados genotipos del gen PRNP caprino pueden jugar en la susceptibilidad o resistencia a la EEB en cabra. Debido a la significativa protección frente a scrapie asociada a la mutación del alelo 222K del gen PRNP (Acutis *et al.*, 2012, Vaccari *et al.*, 2006), se ha llevado a cabo una infección experimental en cabras para definir si ese mismo alelo confiere también resistencia frente a la EEB. Para ello se ha realizado la inoculación de EEB caprina (segundo pase) vía intracerebral a cabras homocigotas Lisina 222KK, cabras homocigotas Glutamina 222QQ y cabras heterocigotas Lisina/Glutamina 222QK.

Los objetivos de dicho experimento son: 1) investigar el efecto de los diferentes alelos del codón 222 del gen PRNP en la susceptibilidad frente a la EEB, con el fin de obtener argumentos para discutir un posible programa de selección genética en la especie caprina como herramienta de control de las EET en esta especie; 2) evaluar la posible transmisión maternal de la BSE en cabras; 3) obtener y analizar material biológico (sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado a mucosa intestinal, músculo y leche) de cabras infectadas por BSE en diferentes estados de la infección, con el fin de definir y cuantificar el riesgo de introducción de la EEB en la cadena alimentaria; y 4) caracterizar las propiedades bioquímicas de la proteína príon patológica en BSE caprina.

Todo ello nos permitirá un mayor conocimiento sobre la EEB caprina para la obtención de alimentos seguros y sanos a través de: 1) estimación del riesgo de introducción de la EEB en la cadena alimentaria a través de productos caprinos (leche y carne); 2) validación de modelos animales de la enfermedad y optimización de herramientas de diagnóstico para una pronta detección de la EEB; y 3) conocimiento básico sobre diversidad de cepas de EET y susceptibilidad de la especie caprina a la EEB.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material: en el estudio se han utilizado 8 cabras homocigotas QQ (5 machos y 3 hembras), dos cabras heterocigotas QK (ambos machos) y 4 cabras homocigotas KK (tres machos y una hembra). Todos ellos fueron inoculados vía intracerebral con un inóculo de EEB caprina aislado de una cabra 222QQ infectada previamente con EEB bovina en fase clínica. Además, se han utilizado un macho KK y un macho QQ como individuos control. Todos los machos fueron castrados excepto los dos controles, un macho KK y otro macho QQ inoculados.

Genotipado: el ADN genómico de todos los animales se extrajo a partir de muestras de sangre mediante un kit comercial (DNeasy de Quiagen) y se realizó una amplificación de la zona variable del gen PRNP mediante una PCR con cebadores específicos. A partir del producto obtenido se realizó una secuenciación directa.

Inoculación: se llevó a cabo mediante una pequeña incisión de la piel de la cabeza, y la subsecuente elaboración de una apertura en la conjunción de los huesos parietal y frontal utilizando un taladro con una broca de 0,5mm de diámetro. Por dicha apertura se inyectó el inóculo de EEB mediante el uso de una aguja de insulina.

Toma de muestras: periódicamente se les ha realizado a todos los animales: a) biopsia de recto cada tres meses con el objetivo de caracterizar la presencia espacio-temporal del depósito de la PrPsc; b) extracción de sangre cada dos meses con citrato dextrosa como anticoagulante y almacenamiento de plasma, suero y coágulo; y c) evaluación de signos clínicos compatibles con la enfermedad. Los animales en estado avanzado de la enfermedad, han sido sacrificados y se ha realizado la necropsia completa, obteniendo el

material biológico a estudio: sistema nervioso central y periférico, órganos linfoides y hematopoyéticos, tracto gastrointestinal y otros órganos y sistemas.

Técnica inmunohistoquímica: se ha valorado la presencia de la proteína patológica aplicando el protocolo inmunohistoquímico utilizado para la confirmación de los casos de EET (Monleón *et al.*, 2003). Concretamente, consiste en un pretratamiento por inmersión en ácido fórmico 98%, digestión con proteinasa K y autoclavado hidratado para el desenmascaramiento de los epítomos, tras el cual se incubaba durante 30 minutos a RT con el anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína prión, L42 (R-Biopharm, Germany).

RESULTADOS Y DISCUSION

Hasta el momento, sólo los machos han sido inoculados, y todas las biopsias de recto han sido negativas para la detección de PrPsc. Sin embargo, los cinco machos homocigotos QQ para el codón 222 han presentado signos compatibles con la enfermedad, y cuatro de estos animales han sido sacrificados. Los signos clínicos aparecieron alrededor de los 15 meses después de la inoculación, y fueron comunes a todos los animales: pérdida de peso, comportamiento anómalo, cambios en la posición de las orejas, temblores y posición anómala de la cabeza, postura anormal de las extremidades delanteras, ataxia e hipermetría. En una de las cabras se observó ausencia de respuesta del reflejo de amenaza. Estos signos son similares a los observados en otros trabajos (Wood *et al.*, 1992), salvo por la ausencia de prurito en el presente experimento. La evolución de la enfermedad fue muy rápida, y los animales fueron sacrificados un mes después de la aparición de los primeros signos. Tras el sacrificio, se realizó la técnica de inmunohistoquímica en muestras de sistema nervioso y tejidos linforreticulares para la confirmación de la enfermedad, pudiendo observarse una amplia distribución y acumulación de la PrPsc por todos los tejidos.

Los resultados obtenidos muestran que el genotipo del gen PRNP en cabras tiene efecto sobre la resistencia a la EEB. Los animales homocigotos Glutamina para el codón 222 (QQ) son más susceptibles a la enfermedad que los KK Lisina homocigotos o heterocigotos QK. Resultados observados en un experimento similar, pero con cepas de scrapie clásico (Acutis *et al.*, 2012) también demostraron la resistencia, frente a scrapie experimental, en cabras homocigotas KK. En el presente experimento, ninguna cabra KQ o KK han mostrado ningún signo clínico compatible con EEB. Por otro lado, el tiempo de incubación en el presente estudio ha sido de aproximadamente 15 meses, mientras que en el estudio de Acutis con scrapie fue más prolongado (19 meses). Sin embargo, aparte de las diferencias entre el scrapie y la EEB, tenemos que tener en cuenta que en este experimento la EEB se adaptó anteriormente en la especie receptora, lo que podría disminuir considerablemente el tiempo de incubación de la enfermedad. Por último, la distribución de PrPsc en el organismo ha sido muy similar en ambos estudios, así como en otros similares (Vaccari *et al.*, 2009), ya que afecta a todas las áreas del cerebro y a los tejidos linforreticulares.

Los resultados futuros proporcionarán datos sobre el posible establecimiento de un programa de cría en cabras similar al de la especie ovina (Dawson *et al.*, 2008) como una herramienta para el control de las EET en esta especie y la gestión del riesgo de introducción de la EEB en la cadena alimentaria. Además, dichos resultados permitirán la evaluación del potencial de modulación de los polimorfismos PRNP en la susceptibilidad y la patogénesis de las EET en cabras, así como la evaluación cuantitativa del riesgo de exposición humana al agente de la EEB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acutis, P.L., Martucci, F., D'Angelo, A., Peletto, S., Colussi, S., Maurella, C., Porcaro, C., Iulini, B., Dell'Attu, L., Zuccon, F., Corona, C., Martinelli, N., Casalone, C., Caramelli, M., Lombardi, G. 2012. *Vet. Rec.* 43:8.
- Dawson, M., Moore, R.C., Bishop, S.C. 2008. *Vet. Res.* 39:25.
- Monleón, E., Monzón, M., Hortells, P., Vargas, A., Badiola, J.J. 2003. *J Histochem Cytochem.* 51(1):15-18.
- Vaccari, G., Di Bari, M.A., Morelli, L., Nonno, R., Chiappini, B., Antonucci, G., Marcon, S., Esposito, E., Fazzi, P., Palazzini, N., Troiano, P., Petrella, A., Di Guardo, G., Agrimi, U. 2006. *J. Gen. Virol.* 87:1395-1402.
- Vaccari, G., Panagiotidis, C.H., Acin, C., Peletto, S., Barillet, F., Acutis, P., Bossers, A., Langeveld, J., van Keulen, L., Sklaviadis, T., Badiola, J.J., Andreóletti, O., Groschup, M.H., Agrimi, U., Foster, J., Goldmann, W. 2009. *Vet. Res.* 40(5):48.
- Wood, J.N., Done, S.H., Pritchard, G.C., Wooldridge, M.J. 1992. *Vet. Rec.* 131:66-68.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto goatBSE (FOOD-CT-2006-36353); por el proyecto COTSA Interreg y por el Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI). Los autores desean agradecer la colaboración del SAI, Universidad de Zaragoza; la asistencia y ayuda proporcionada por los cuidadores y técnicos del Centro de Investigación en Enfermedades Priónicas y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

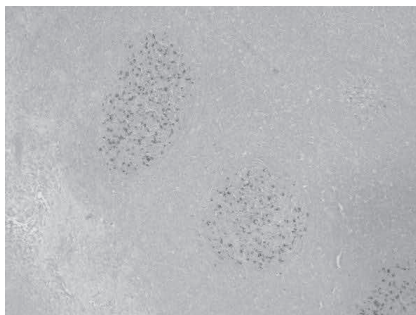


Figura 1. Depósito de PrPsc en tonsila (4x)

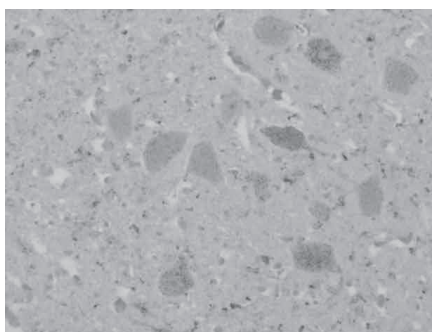


Figura 2. Depósito de PrPsc en médula espinal cervical (20x)

INFLUENCE OF THE DIFFERENT ALELES OF CODON 222 OF PRNP GENE ON SUSCEPTIBILITY TO BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN GOATS

ABSTRACT: The purpose of this study is to identify the role that different genotypes of PRNP gene could play in the susceptibility or resistance to BSE in goats. An experimental work has been carried out to define if the allele 222K of PRNP gene confers resistance against BSE, inoculating it intracerebrally to homozygous KK goats for codon 222, to homozygous QQ goats, and to heterozygous QK goats. All animals homozygous QQ have had signs compatible with BSE, and four of them have been slaughtered. Clinical signs have appeared about 15 months post-inoculation, and were common to all animals: weight loss, abnormal behavior, head tremors, head twisting, ataxia and hypermetria. The evolution of the illness was fast, and the animals were slaughtered barely a month later. Genotype of PRNP gene in goats has demonstrated an effect on the resistance to clinical BSE development. Those animals homozygous QQ for codon 222 have demonstrated more susceptibility to the disease than those homozygous KK or heterozygous QK. Future results will provide data for the possible establishment of a breeding program in goats as a tool for control of TSEs in this species and the management of the risk of introducing BSE into the food chain.

Keywords: BSE, goat PRNP, resistance, food safety.

ESTUDIO DE TRANSMISIBILIDAD DEL SCRAPIE ATÍPICO Y LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA OVINA EN LA ESPECIE PORCINA

Hedman, C.¹, Marín, B.¹, Corbière, F.⁴, Filali, H.¹, Vázquez, F.², Romero, A.²,
Hernandez, R.¹, Pitarch, J.L.¹, Girón, W.¹, Sarasa, R.¹, Garza, MC.¹, Vidal, E.³,
Pumarola, M.³, Bolea, R.¹, Andreoletti, O.⁴, Badiola, J.J.¹

¹Centro de Inv. en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, Fac. de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013. hedman@unizar.es

²Priocat, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA.

³Fac. de veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

⁴UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hotes Agents Pathogenes, Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, France.

INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, de curso lento e irreversible con desenlace fatal. Se conocen distintas enfermedades de este tipo que afectan a la especie humana, a muchos mamíferos de interés agropecuario como ovejas, cabras y vacas, y a otros domésticos como los gatos o salvajes como ciervos, visones y alces. Estas enfermedades son producidas por la forma patológica de una proteína denominada "prión" y pueden ser transmitidas de unas especies a otras, a través del consumo de productos o subproductos de animales infectados. No existe conocimiento sobre la ocurrencia natural de EET en cerdos. Las primeras investigaciones sobre enfermedades priónicas en la especie porcina describen un intento fallido de transmitir el Kurú a cerdos que permanecieron bajo observación por un periodo de 52 a 76 meses (Gibbs *et al.*, 1979). Con el comienzo del programa de control de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) en el Reino Unido, se cree que varias especies domésticas fueron expuestas al consumo de harinas de carne y hueso de rumiantes. Posteriormente se llevaron a cabo estudios para determinar la transmisibilidad del agente causal de la EEB a la especie porcina a través de vías parenterales de inoculación y de la alimentación. Finalmente se consiguió la transmisión de la enfermedad tras la inoculación simultánea por las vías intracerebral, intravenosa e intraperitoneal, habiendo recibido cada cerdo una dosis de un gramo de homogeneizado de encéfalo de vacas afectadas con EEB (Dawson *et al.*, 1990). Sin embargo, no se ha demostrado la transmisión oral de la EEB en cerdos (Dawson *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 2003). La posible propagación del agente de la EEB en otras especies que forman parte de la cadena alimentaria humana como son las ovejas, cabras y cerdos, debe ser considerada por representar un riesgo potencial para la infección por priones en humanos. Por otro lado, el uso de cerdos como donantes de tejidos para injertos podría causar preocupación, dada la descripción de la variante de Creutzfeld Jacob (vCJD) en un paciente humano receptor de dura madre porcina (Heath *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo es evaluar por primera vez la transmisión de 3 cepas de priones en los cerdos y determinar su susceptibilidad clínica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos se desarrollaron bajo la licencia P113/10 del proyecto COTSA, aprobada por el comité ético de experimentación animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de animales se realizaron de acuerdo con la Política Española de Protección de los Animales RD1201/05, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 86/609 relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación. Para este estudio, 21 cerdos con edades de 7 a 9 meses fueron divididos en tres lotes de siete animales cada uno. Los lotes 1 y 2 fueron inoculados con dos diferentes cepas de scrapie atípico; mientras que el grupo 3 fue inoculado con el agente de la EEB obtenido de ovejas experimentalmente infectadas (EEBov). La inoculación se realizó por vía intracerebral, depositando 0,5ml de homogeneizado al 10% de encéfalo de animales positivos en solución salina. Los animales fueron

observados y evaluados periódicamente. Los signos clínicos propios de una EET se asociaron con la presentación de cambios comportamentales y anomalías en la marcha o con una reacción exagerada a estímulos (respuesta a la amenaza o la prueba del cuello), como descrito en experimentos similares (Konold *et al.*, 2006, Wells *et al.*, 2003, Wells *et al.*, 2006). Los sacrificios de los animales estudiados se realizaron con una sobredosis intravenosa de pentobarbital, cuando los cerdos se encontraban en un estado clínico terminal. A la necropsia, muestras del sistema nervioso central (SNC), tracto digestivo, aparato respiratorio y otros órganos, fueron tomadas por duplicado, una de ellas destinada a la solución de formol al 10% y la otra a congelación a -80°C. Las muestras fijadas en formol fueron procesadas en bloques de parafina. Las preparaciones histológicas de 4µm fueron teñidas con Hematoxilina Eosina para su posterior evaluación histopatológica. Las lesiones fueron valoradas según intensidad de 0 a 5. La identificación de la PrP^{sc} se hizo mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo 2G11 en secciones del encéfalo. A su vez, se realizó la técnica de Western Blotting (WB) para estudiar el patrón de glicosilación de la PrP^{sc} en el scrapie atípico (TeSeE WESTERN BLOT-355-1169) y en EEB (Prionics®-Check WESTERN BSE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La siguiente presentación comprende resultados parciales para evaluar el potencial de transmisión del scrapie atípico y del agente de la EEB pasado en ovejas por la vía intracerebral. Ningún cerdo de los grupos 1 y 2, inoculados con las cepas de scrapie atípico, ha presentado signos neurológicos clínicos compatibles con una EET, 34 meses post inoculación (mpi). Sin embargo, en ratones transgénicos que expresan PrP^c porcina se ha conseguido transmitir la infección con el agente del scrapie atípico, aunque en un bajo porcentaje (Espinosa *et al.*, 2009). En contraste, en el grupo 3, inoculado con EEBov, los signos clínicos fueron evidentes ya a los 19 mpi en un cerdo (P_1224). Los periodos de incubación variaron entre 19 y 27 mpi, utilizando sólo una vía de inoculación (Konold *et al.*, 2009; Ryder *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2003), en contraste con estudios en los que utilizaron la vía intracerebral, intravenosa e intraperitoneal y un mayor volumen de homogeneizado para reproducir la enfermedad (Dawson *et al.*, 1990). Los signos clínicos fueron similares en todos los cerdos afectados, presentando al inicio cambios de comportamiento, nerviosismo, confusión y depresión. Estos cambios de comportamiento se acompañaban al inicio de una leve ataxia de miembros posteriores, progresando en un desorden generalizado en la locomoción hasta, finalmente, alcanzar un decúbito persistente y dificultades para ponerse en pie, signos compatibles con la EEB en bovinos (Braun *et al.*, 1998; Konold *et al.*, 2009) y porcinos (Konold *et al.*, 2009). Un cerdo de cada grupo (1,2 y 3) fue sacrificado durante el periodo preclínico. A pesar del avanzado periodo de incubación en los cerdos del grupo uno y dos (21 y 28 mpi) no se observó ningún cambio histopatológico. En los estudios inmunohistoquímicos, el cerdo P_1226 del grupo 1 presentó un leve a moderado marcaje de la PrP^{sc}, con un evidente patrón lineal en corteza cerebral e hipocampo. En P_1217 del grupo 2 y el P_1219 del grupo 3 resultaron negativos a esta técnica (8mpi). Los 3 cerdos preclínicos fueron negativos a la detección del prión por WB. No se ha observado algún cambio clínico/de comportamiento en los restantes cerdos de los grupos 1 y 2. Lesiones vacuolares severas fueron observadas en diferentes regiones del encéfalo de los 6 animales clínicamente afectados del grupo 3. En 5 de ellos la corteza cerebral presentó espongiosis y vacuolización severa. Las lesiones se localizaron principalmente en las capas más profundas de la sustancia gris en corteza frontal y reduciendo gradualmente en occipital. El cerdo P_1221 mostró una moderada vacuolización en corteza cerebral, pero una severa espongiosis y vacuolización en núcleos basales. El núcleo caudado presentó un gran cambio esponjiforme mientras que el núcleo septal fue moderado en los 6 cerdos afectados. Todos los animales presentaron lesiones importantes en el tálamo, y un cambio moderado en hipotálamo. En cerebelo, la capa granular y molecular mostraron lesiones vacuolares intensas. En contraste, las lesiones halladas en medula oblongada fueron más moderadas. En todos los tejidos

del encéfalo de los animales clínicos, el inmunomarcaje (detección de PrP^{sc}) resultó positivo, con mayor intensidad en sustancia gris de corteza cerebral, coincidiendo con las lesiones localizadas entre las capas IV y VI. Los perfiles de depósito de PrP^{sc} predominantes fueron el punteado fino, seguido del perivacuolar, perineuronal y en menor medida agregados amorfos. Otras regiones con un alto grado de depósito de PrP^{sc} fueron los núcleos basales, tálamo e hipotálamo, el hipocampo, que presentó un moderado inmunomarcaje a pesar de no mostrar intensas lesiones vacuolares. Asimismo, el cerebelo de todos los animales presentó una gran reacción a la presencia de PrP^{sc}. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en la EEB, la médula oblongada presentó menos cantidad de depósito de PrP^{sc} y de espongirosis. El WB reveló un patrón de 3 bandas con una predominante banda monoclonosilada en los cerdos clínicamente positivos. En los animales preclínicos se obtuvieron resultados negativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Braun, U., Pusterla, N., Schicker, E., 1998. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 20, S270-+. ● Dawson, M., Wells, G.A.H., Parker, B.N.J., Scott, A.C., 1990. Veterinary Record 127, 338-338. ● Espinosa, J.C., Herva, M.E., Andreoletti, O., Padilla, D., Lacroux, C., Cassard, H., Lantier, I., Castilla, J., Torres, J.M., 2009. Emerging Infectious Diseases 15, 1214-1221. ● Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., Amyx, H. 1979. Vol 2, S. B. Prusiner & W. J. Hadlow Edition. Academic Press, New York. ● Heath, C.A., Barker, R.A., Esmonde, T.F., Harvey, P., Roberts, R., Trend, P., Head, M.W., Smith, C., Bell, J.E., Ironside, J.W., Will, R.G., Knight, R.S. 2006. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77, 880-882. ● Konold, T., Spiropoulos, J., Chaplin, M.J., Thorne, L., Spencer, Y.I., Wells, G.A., Hawkins, S.A. 2009. BMC Vet Res 5, 35. ● Ryder, S.J., Hawkins, S.A., Dawson, M., Wells, G.A. 2000. J Comp Pathol 122, 131-143. ● Wells, G.A., Hawkins, S.A., Austin, A.R., Ryder, S.J., Done, S.H., Green, R.B., Dexter, I., Dawson, M., Kimberlin, R.H. 2003. J Gen Virol 84, 1021-1031.

TRANSMISION STUDY OF ATYPICAL SCRAPIE AND SHEEP-BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY TO SWINE: PRELIMINARY FINDINGS

ABSTRACT: The susceptibility of other species to transmissible spongiform encephalopathies (TSE) grows when some sectors of the European Union raises the possibility of lifting the ban on feeding pigs and poultry with animal meal. Moreover, the use of pigs as graft donor could cause concern, given a report of Creutzfeldt-jacob variant (vCJD) in the recipient of a porcine dura mater graft. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) can be experimentally produced in swine by inoculating infected material by several routes simultaneously 3 groups of 7 pigs, were inoculated with 2 atypical scrapie strains and the agent of BSE passaged in sheep (BSEs). Animals were under clinical observation. Western blot, histopathology and immunohistochemistry was performed to confirm the diagnosis. Clinical signs compatible with TSE, vacuolar changes and several pattern of immunopositivity were identified in different regions of the brain from affected pigs. Different neuropathology was observed between pigs infected by the atypical scrapie and BSEs agent. This study confirms that the susceptibility of pigs to TSE and the high pathogenicity of the BSEs agent demonstrated in mice model. The aim of the work will be the determination of the pig neuropathology associated to this kind of prion infection.

Keywords: TSE/SHEEP/SWINE

DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR-DUPLEX DE LA NUEVA VARIANTE RHDVb DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA EN CONEJOS.

Sarto, P.¹, Calvo, J.H.^{1,2}, Calvo, A.J.³, Monroy, F.³, Calvete, C.¹

¹ CITA Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. ² ARAID. ³ TRAGSATEC, Gerencia Sanidad Animal, Julián Camarillo 6 B, 28037 Madrid. mpsarto@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica vírica del conejo (RHD) es una enfermedad altamente contagiosa compartida entre el conejo silvestre y el doméstico, si bien en la mayoría de las ocasiones se podría considerar a aquel como el principal reservorio de la enfermedad para la cunicultura doméstica. Esta enfermedad suele cursar con elevadas mortalidades en las explotaciones cunícolas, especialmente entre los reproductores y hacia la finalización del cebo, siendo una enfermedad fácilmente controlable mediante la aplicación de un protocolo de vacunación. Esta enfermedad es enzoótica en las poblaciones de conejo silvestre, con brotes epizooticos que suelen aparecer en primavera u otoño. El agente etiológico de la misma es un miembro del grupo de los calcivirus, grupo caracterizado por su facilidad para mutar y originar nuevas variantes. El virus RHD, aparentemente, se originó a partir de un ancestro no patogénico presente en el Centro y Norte de Europa. En la Península Ibérica no se han encontrado evidencias de que existiese ese ancestro no patogénico, de tal forma que todas las cepas de RHD aisladas hasta la actualidad parecen proceder de una única cepa patógena causante de las primeras epizootias ocurridas a finales de los años ochenta, sugiriendo el aislamiento geográfico de la Península Ibérica respecto del resto de Europa debido al efecto barrera de los Pirineos (Alda *et al.*, 2010).

No obstante, durante el año 2011, se detectaron, inicialmente en el tercio norte de España, una serie de brotes de RHD que cursaron de forma atípica, con incremento de la mortalidad en las granjas afectadas incluso en animales con menos de 30 días de edad, y con una clara y grave disminución de la eficacia de la vacunación (Comenge y Mora, 2011). La epidemiología de estos brotes atípicos se asemejó mucho a la denunciada en brotes de RHD acaecidos en Francia meses antes (desde octubre de 2010) y en donde se identificó, como agente etiológico, una nueva variante del virus relativamente diferente de las aisladas hasta entonces en ese país (LeGall-Reculé *et al.*, 2011). La caracterización del agente etiológico implicado en los brotes de mortalidad acaecidos en granjas cunícolas españolas confirmó la presencia de esta nueva variante emparentada genéticamente con los calcivirus apatógenos del conejo, denominándola RHDVb (Dalton *et al.*, 2012), que también fue detectada simultáneamente afectando a poblaciones de conejo silvestre ubicadas en la finca experimental "El Vedado" perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y localizada en el municipio de Zuera (Zaragoza) (Calvete *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se presenta la puesta a punto de un protocolo que permite identificar las dos variantes del virus mediante PCR-Duplex, así como la evolución de la prevalencia de ambas variantes víricas en los casos de mortalidad por RHD acaecidos en una población experimental de conejos silvestres.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dentro de un proyecto orientado a profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la RHD, financiado a través de un Convenio de Colaboración por el Grupo TRAGSA, y desarrollado en el CITA durante los años 2008-2011, en 2009 se creó una población de conejos silvestres en la finca experimental "El Vedado". Esta población fue monitorizada desde 2009 hasta 2012, con una frecuencia bisemanal, con el objetivo, entre otras cosas, de hallar cadáveres de conejos muertos que fueron llevados al laboratorio para proceder a su necropsia e identificación del virus RHD en tejido hepático.

Para la identificación del virus, la extracción del ARN se realizó usando *TRI@REAGENT* (*Sigma Life Science*). El ADNc fue obtenido utilizando el kit *SuperScript@III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*) y cebadores específicos del gen que codifica la proteína de la cápside VP60: 5'-GCAACCAGTACCTGGAGGG-3' y 5'-CCAATTGTTACTGGCAGTGTT-3' (Moss *et al.*, 2010). Posteriormente, sobre el ADNc específico de la proteína VP60 se realizó

una amplificación específica mediante PCR, utilizando los cebadores: 5'-TTGGAACCTTGAATGGCAGCA-3' y 5'-TCACCGGTGCGCCTGACGAC-3' (Moss *et al.*, 2010), siendo las condiciones de amplificación las descritas por Alda *et al.* (2010). Este protocolo de diagnóstico fue aplicado, en primer lugar, a 140 muestras pertenecientes tanto a conejos encontrados muertos en la población experimental (durante los años 2009-2011), con casuística de mortalidad diversa, entre los que se incluyeron ejemplares muertos por alguna de las dos variantes de RHD, como a conejos muertos tras la inoculación experimental con la variante clásica.

Posteriormente, mediante el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) se alinearon las secuencias obtenidas en este estudio y se diseñaron cebadores específicos para la cepa clásica de RHD (código GenBank JQ627640) y la nueva variante RHDVb (código GenBank JQ627641) mediante el programa Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>): 5'-GCTTCCCTGACATGTCGTTT-3' y 5'-GCAACAATCTGTGAGCCTGA-3' (variante clásica); 5'-CCAAATTGCTCCAGATGGTT-3' y 5'-AATCCTGTTTGGCTGAGGTG-3' (variante RHDVb). De esta manera, sobre 2.5 µ de ADNc específico de la proteína VP60 obtenido tras la retrotranscripción se realizó una PCR-Duplex, con los cebadores anteriormente descritos, con el fin de diagnosticar la presencia del virus y la variante implicada. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 7.5 pmol de cada cebador, 200 µM dNTPs, 2.2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 1 U *Taq* polymerase (Hotsplit, Biotools, Spain) y 2.5 µl de cDNA obtenido tras la transcripción. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos: 94°C 45 s, 60°C 45 s y 72°C 45 s.

Este nuevo protocolo de diagnóstico fue aplicado de nuevo únicamente a las muestras procedentes de conejos encontrados muertos en la población experimental con el fin de estimar la variación de la prevalencia relativa de ambas variantes en los casos de mortalidad a lo largo del período de estudio. En este caso se incluyeron también las muestras obtenidas durante el año 2012.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el primer protocolo se obtuvo una amplificación positiva en 55 muestras de hígado de las 140 analizadas. Estas muestras se secuenciaron identificando 40 muestras como variante clásica y 15 como RHDVb. Posteriormente, utilizando la PCR dúplex basada en las secuencias que amplificaban fragmentos del ADN que codifica para la proteína de la cápside VP60 de 199 y 343 pares de bases (pb) para la variante clásica y la nueva RHDVb, respectivamente, se diagnosticaron, sobre las 140 muestras iniciales, 52 animales positivos a la cepa clásica original, y 34 a la RHDVb. La especificidad de la técnica entre la PCR-Duplex y el diagnóstico por secuenciación fue del 100%.

En total se encontraron 89 animales positivos a RHD frente a los 55 encontrados con los cebadores descritos por Moss *et al.* (2010). Este incremento de casos positivos pudo ser debido a la mayor especificidad de los cebadores, así como a la mayor sensibilidad de la técnica, siendo capaces de detectar menores tasas víricas en hígado. Así, la PCR-duplex, mostró una mayor especificidad en el diagnóstico, disminuyendo el número de falsos negativos, permitiendo diferenciar entre las dos variantes víricas en un solo proceso.

Respecto a la evolución de la prevalencia de ambas variantes en los casos de mortalidad por RHD, en la Tabla 1 se puede observar cómo la variante clásica fue la única identificada en los años 2009 y 2010. No obstante durante 2011, año en el que se detectó la RHDVb, su prevalencia bajó al 26%, siendo no detectada en ninguno de los casos ocurridos en 2012, en los que únicamente fue detectada la nueva variante. En tres de las muestras analizadas en 2011 se detectaron evidencias de coinfección por ambas variantes, todas ellas en conejos jóvenes del año. Aunque no es imposible descartar una coinfección simultánea, probablemente estos casos se debiesen a animales jóvenes portadores asintomáticos de la variante clásica que murieron como consecuencia de la infección por la RHDVb. En cualquier caso, la evolución de las prevalencias observada en este trabajo evidencian una clara ventaja competitiva de la nueva variante RHDVb que, virtualmente, parece haber desplazado a la variante clásica preexistente. Teniendo en cuenta que el conejo silvestre es el principal reservorio de esta enfermedad para los conejos domésticos, estos resultados tienen una gran implicación en la cunicultura doméstica ya que sugieren que la nueva variante será el principal, sino el único, agente etiológico de la RHD en un futuro próximo y que, por lo tanto, parece imperativo que las vacunas comerciales incorporen cuanto antes esta nueva valencia frente a la variante RHDVb.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alda, F., Gaitero, T., Suarez, M., Merchán, T., Rocha, G. & Doadrio, I. 2010. *BMC Evol. Biol.* 10:347.
- Calvete, C., Calvo, J.H., Sarto, M.P. 2012. XXXVII Symposium de Cunicultura de La Asociación Española de Cunicultura (ASESCU). Barbastro (Huesca). 112-115p.
- Comenge, J. & Mora, F.X. 2011. *Cunicultura* 36(213):7-10.
- Dalton, K.P., Nicieza, I., Balseiro, A., Muguerza, M.A., Rosell, J.M., Casais, R., Alvarez, A.L., Parra, F. 2012. *Emerg. Infec. Dis.*, 18:2009-2012.
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decor, s A., Bertagnoli, S., Guérin, J.L. & Marchandeau S. 2011. *Vet. Rec.* 168:137-138.
- Moss, S.R., Turner, S.L., Trout, R.C., White, P.J., Hudson, P.J., Desai, A., Armesto, M., Forrester, N.L. & Gould, E.A. 2002. *J. Gen. Virol.*, 83(10):2461-2467

Agradecimientos: Este trabajo es resultado de un proyecto de I+D+i financiado a través de un Convenio de Colaboración por el Grupo TRAGSA, y desarrollado por la Gerencia de Sanidad Animal del citado Grupo y el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Este Centro también ha participado con la financiación de los trabajos realizados durante 2012.

Tabla 1: Evolución de la prevalencia (%) de ambas variantes víricas en los casos de mortalidad por RHD a lo largo del estudio.

	2009	2010	2011	2012
Muestras analizadas	4	65	40	30
Muestras positivas a RHD	3	24	34	9
Muestras RHDV clásica	3	24	9	0
Muestras RHDVb	0	0	25 *	9

* Tres muestras con evidencia de coinfección por ambas variantes.

DETECTION AND DIAGNOSIS OF THE NEW VARIANT RHDVb OF RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS IN WILD RABBITS IN SPAIN BY PCR-DUPLEX

ABSTRACT: Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) is a virulent calicivirus that causes high mortality both in domestic and wild rabbits. In this work, two RHDV strains were detected. The first one viral strain had been previously isolated and belonged to viral Lineage I which includes all RHDV isolates found in the Iberian Peninsula to date (classical strain). The second one was the new variant RHDVb. A duplex PCR using specific primers for the two viral strains was developed to increase the sensibility and specificity of the diagnosis. Then, duplex PCR was used to recording, from 2009 to 2012, the variation of prevalence of both viral strains in rabbits dead by RHD in an experimental wild rabbit population. Results showed an evident predominance of the new variant across time, with no detection of the classical strain in 2012, one year after the first report of the new variant. Since wild rabbit populations are the main reservoir of RHD virus for domestic rabbits, it seems necessary and urgent the inclusion of the RHDVb valency in commercial vaccines against RHD.

Keywords: PCR, Rabbit haemorrhagic disease, phylogenetic analysis, European wild rabbit

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA EN VENEZUELA.

Virla, J., Aranguren, J.A., Portillo, M.G., Quintero-Moreno, A., Zapata, D., Fernández J., Trujillo, M. y Mejía-Silva W.

Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. E-mail: willian.mejia@fcv.luz.edu.ve

INTRODUCCIÓN

La Peste porcina clásica (PPC), también conocida como cólera porcino o fiebre porcina clásica, es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a los cerdos domésticos y salvajes de todas las edades, que se caracteriza por producir lesiones de tipo hemorrágico en múltiples órganos en los animales susceptibles, provocando una alta morbilidad y mortalidad en las granjas afectadas (Le Potier *et al.*, 2006). El virus de la peste porcina clásica (VPPC) es el agente causal de la PPC, este virus pertenece al género *Pestivirus* y a la familia *Flaviviridae* (Arias *et al.*, 2003), el cual incluye también al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y al de la enfermedad de la frontera (EF). Estos virus guardan una estrecha relación genómica, por lo que son muy parecidos estructural y antígenicamente con el virus de la PPC.

La PPC ha sido descrita en diferentes partes del mundo en donde la producción de los cerdos es importante. En Venezuela la enfermedad fue descrita por primera vez en 1941, desde entonces se presenta de forma endémica (Rolo *et al.*, 2004). En el año 1998 se estableció un programa de control y erradicación de la PPC, sin embargo, hasta el momento no se ha podido cumplir con las metas establecidas. Un estudio realizado por Rolo *et al.* (2004) concluyen que el virus de la PPC se encuentra activo en Venezuela y que los porcentajes de vacunación son muy bajos.

Desde el año 1941 hasta el presente, el diagnóstico de la PPC en Venezuela es realizado por laboratorio oficial (CENIAP/INIA) utilizando la técnica de inmunofluorescencia directa (Rolo *et al.*, 2004). Recientemente se han implementado técnicas moleculares como la reacción en cadena por la polimerasa- transcripción reversa (RT-PCR) para el diagnóstico de la PPC (Escatel *et al.*, 2003; Harding *et al.*, 1994; Risatti *et al.*, 2003). Sin embargo, en Venezuela no se ha desarrollado la metodología de tipo molecular para el diagnóstico de la PPC, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de RT-PCR para la detección del virus de la PPC en Venezuela.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus y extracción de ARN viral.

La extracción del ARN total se realizó a partir de una vacuna comercial contra la PPC (control positivo) con una concentración de $10^{2.5}$ TCDI₅₀/ml de la cepa China adaptada a cultivo celular (FORT DODGE, SAÚDE ANIMAL LTDA.- Campinas, Brazil) y de tejidos (tonsilas, nódulos linfáticos, riñón, bazo, sangre) procedente de cinco cerdos inoculados experimentalmente (cepa Maracay) utilizando el reactivo de TRIZOL[®] (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA).

Reacción en cadena de la polimerasa -transcripción reversa- (RT-PCR).

La RT-PCR se diseñó utilizando los iniciadores descritos por Agüero *et al.* (2004). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de un tamaño de 108 pares de bases (pb) a partir de una sección conservada de la región no codificante del extremo 5' del genoma viral (5'-NTR). Para la realización de la prueba RT-PCR se utilizó un kit comercial ONE STEP RT-PCR KIT (Qiagen GMBH, Hilden, Alemania). Para medir la efectividad de la reacción, se realizó análisis electroforético de 10 µl del producto amplificado en geles de agarosa al 2 % conteniendo 0,5 µg/ml bromuro de etidio.

Sensibilidad y Especificidad.

Para determinar la sensibilidad de la técnica se realizaron diluciones décuples a partir de la cepa vacunal. La prueba de especificidad se realizó mediante el análisis del genoma viral de otro miembro del género *Pestivirus* como es el virus de la Diarrea Viral Bovina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de validar y estandarizar una prueba molecular para el diagnóstico de la PPC en Venezuela, se realizaron una serie de pruebas confirmatorias de la factibilidad de

aplicar esta técnica de diagnóstico molecular. A partir de la cepa vacunal y de los tejidos procedentes de los animales inoculados experimentalmente se amplificó el producto esperado de 108 pb (Fig. 1, columna 1). En el ensayo de sensibilidad se pudo obtener un producto de amplificación visible hasta la muestra extraída de 250 μ l de la dilución 10^{-1} correspondiente a una concentración de $10^{1.5}$ TCDI₅₀/ml (Fig. 1, columna 5), Lo que indica que bajo las condiciones establecidas, la técnica de RT-PCR fue capaz de detectar hasta 0,32 partículas infectivas mínimas por ensayo de RT-PCR. En cuanto a la especificidad, no se obtuvo ningún producto amplificado de la cepa del VDVB (Figura 1, columna 8). Estos resultados son similares a los descritos por Agüero *et al.* (2004) donde destacan la alta sensibilidad de la prueba para detectar el VPPC en muestras procedente de animales inoculados experimentalmente. La similitud de los resultados de sensibilidad y especificidad implica un excelente desempeño de los cebadores.

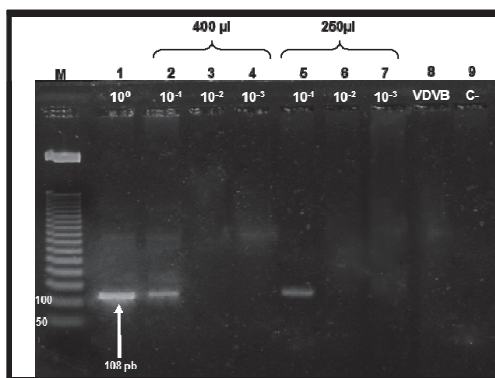


Figura 1. Resultados de la prueba de sensibilidad y especificidad para la detección del VPPC. M: marcador de peso molecular (50bp dna step ladder from promega, madison, wisconsin). Línea 1: suspensión de la cepa viral con una concentración de $10^{2.5}$ tcdi₅₀/ml. Línea 2-7: diluciones del virus de la PPC. Línea 8: cepa del VDVB. Línea 9: control negativo.

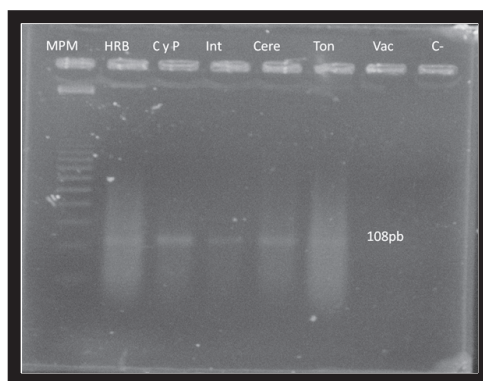


Figura 2. Resultado de la amplificación de ARN viral de las muestras de tejidos. MPM: marcado de peso molecular (50bp dna step ladder from promega, madison, wisconsin). HRB: hígado, riñón, bazo. C y P: corazón y pulmón. Int: intestino. Cere: cerebro. Ton: tonsila. Vac: vacuna como control positivo. C-: control negativo de la PCR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agüero, M., Fernández, J., Romero, I., Zamora, M., Sanchez, C., Belak, S., Arias, M., Sanchez-Vizcaino, J. 2004. J. Clin. Microbiol. (41):4430-4434. • Arias, M., Romero, I., Gómez-Villamandos, J.C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2003. [Http://www.sanidadanimal.info/inmuno/inicio.htm](http://www.sanidadanimal.info/inmuno/inicio.htm). • Escatel, G.S., Varga, F.D., Salas, E.C., García, M., Díaz, C.A., González, A.M. 2003. Téc. Pecu. Méx. 41(1):105-110. • Harding, M., Lutze-Wallace, C., Pru'dhomme, J., Zhong, X., Jerzy, R. 1994. J. Clin. Microbiol. 32 (10):2600-2602. • Le Potier, M.F., Mesplede, A., Vannier, P. 2006. Diseases of Swine 9th edition, Barbara E. Straw (editor). Iowa State University press Ames. Iowa. U.S.A. Pp 309-322. • Risatti, R.G., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Borca, M.V. 2003. J. Clin. Microbiol. 41(1):500-505. 2003. • Rolo, M., Clavijo, A. & Alfaro, C. 2004. Revista digital CENIAP hoy. Número especial. Maracay, Aragua, Venezuela. http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/rolo_m/arti/rolo_m.htm.

STANDARDIZATION OF RT-PCR TEST FOR DIAGNOSIS OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS IN VENEZUELA

ABSTRACT: Classical swine fever (CSF) is a highly contagious viral disease affecting domestic and wild swine of all the ages, characterized by hemorrhagic lesions in multiple organs in susceptible pigs. In Venezuela, CSF was firstly described in 1941, since then, it is considered endemic. Diagnosis is done with direct immunofluorescence (IF) and molecular technology for CFS diagnosis has not been implemented. The aim of this trial was to establish and standarize the RT-PCR test in order to have an additional confirmatory test for CFS. Since the vaccine strain and tissue from animals experimentally inoculated amplified the expected product of 108 bp, corresponding to an 5-NTR gene fragment. In sensitivity test the RT-PCR technique was able to detect up to 0.32 minimum infective particles by RT-PCR assay. Regarding the specificity, no amplified product obtained from any strain of Bovine Viral Diarrhea. Because RT-PCR is highly sensitive, easy to perform and provides rapid results, it can be used as a complementary classical swine fever diagnostic test

Keywords: classical swine fever, diagnosis, RT-PCR.

PRECISIÓN DEL TEST DE ECLOSIÓN DE HUEVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN CONDICIONES DE CAMPO.

Calvete, C., Calavia, R. y Uriarte, J.

CITA de Aragón. Avda de Montañana 930. 50059-Zaragoza. ccalvete@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La administración de compuestos antiparasitarios constituye el método más extendido para el control de las infecciones por nematodos gastrointestinales en los sistemas de producción ovina y caprina en pastoreo, lo que ha ocasionado la aparición de fenómenos de resistencia en las poblaciones de parásitos.

El test de eclosión de huevos, también denominado EHA (*egg hatch assay*), es una de las técnicas *in vitro* frecuentemente utilizadas para el diagnóstico de la resistencia frente a bencimidazoles. Esta técnica es, básicamente, un ensayo de dosis-respuesta con el que se calcula la concentración de antihelmíntico, normalmente tiabendazol, capaz de inhibir la eclosión del 50% de los huevos, si bien también se utiliza un protocolo simplificado en el que se estima la proporción de huevos eclosionados a una única concentración, o dosis discriminante, de tiabendazol, típicamente 0,1 µg/ml. La *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.) recomienda que el test se realice con dos réplicas al menos (Coles *et al.*, 1992).

Algunos trabajos (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2009) han estudiado la variabilidad de la técnica en condiciones de laboratorio, sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ninguna valoración de su variabilidad en condiciones de campo. Por este motivo en el presente trabajo se ha tratado de estimar la precisión del EHA aplicado a la monitorización de los niveles de resistencia de dos poblaciones parasitarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desde diciembre de 2011 a noviembre de 2012 se midieron con frecuencia mensual, los niveles de resistencia frente a bencimidazoles de las poblaciones parasitarias de dos grupos de 18 ovejas adultas cada uno, mantenidos en dos praderas permanentes de aproximadamente 1,3 ha de extensión. Una pradera estuvo ubicada en la finca experimental de montaña, perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), localizada en Bescós de la Garcipollera (Huesca), a 930 m de altitud, mientras que la otra, mantenida en regadío, se localizó en las instalaciones del mencionado Centro, en el Valle del Ebro, a 240 m de altitud y próxima a la ciudad de Zaragoza (Campus de Aula Dei). Durante todo el estudio las ovejas estuvieron fuera del ciclo productivo de sus respectivos rebaños (no fueron cubiertas), permaneciendo constantemente recluidas dentro de sus respectivas praderas sin que les fuese aplicado ningún tratamiento antiparasitario.

Cada mes se procedió a la extracción de heces, directamente del recto, de todas las ovejas de cada grupo. El total de heces recogidas por grupo fue homogeneizado y una fracción se utilizó para la realización de un coprocultivo con el que estimar la abundancia relativa de los diferentes géneros parasitarios. El resto del homogeneizado fue procesado para la obtención de los huevos utilizados en la realización del EHA en placa de 24 pocillos, con un pocillo control (sin antihelmíntico) y un pocillo con dosis discriminante de tiabendazol (0,1 µg/ml), replicándose ambos tres veces en la misma placa. Este mismo proceso de muestreo y análisis se realizó durante tres días consecutivos cada mes, de tal manera que para cada población parasitaria y mes se realizaron tres ensayos (uno por día) con tres réplicas cada uno. El nivel de resistencia se valoró a las 48 horas como la proporción de huevos eclosionados a dosis discriminante (Pdd), una vez corregida por la mortalidad natural (no eclosión) estimada en los pocillos control. La manipulación de la muestra de huevos de parásitos y la preparación del EHA se ajustó a las recomendaciones de la W.A.A.V.P. (Coles *et al.*, 1992).

Para comprobar la asociación entre la variación mensual de Pdd y la variación de las abundancias relativas de los diferentes géneros parasitarios se ajustaron modelos de regresión lineal. Con el fin de evaluar la precisión inherente al EHA, se calcularon los componentes de la varianza correspondiente a los meses, los días de muestreo y las réplicas de EHA efectuadas dentro de cada placa. El componente de la varianza correspondiente a los meses se consideró una estimación de la variabilidad extrínseca al método, mientras que los dos últimos, correspondientes a la variabilidad entre- e intra-

muestreo, se consideraron como la variabilidad propia del método. El cálculo de los componentes de la varianza se realizó utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud restringida (REML) y fue realizado separadamente para cada población parasitaria.

A partir de los componentes de la varianza entre- e intra-muestreos se estimó la precisión del método como el valor absoluto del semi-intervalo de confianza del 95% (SIC-95%) calculado para las condiciones del presente ensayo (tres muestreos consecutivos con tres réplicas cada uno), así como para las siguientes combinaciones de diseño muestral: de 1 a 5 muestreos consecutivos con 1 a 6 réplicas cada uno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición de géneros y su variación difirió notablemente entre ambas poblaciones parasitarias (Fig. 1). La Pdd mensual fue superior en la población de montaña (0,81; SD=0,05) que en la del Valle del Ebro (0,47; SD=0,23), si bien esta última mostró una variación mayor (CV=48,91%) que la anterior (CV = 6,46%). Los modelos de regresión lineal no detectaron ninguna asociación entre la variación mensual de Pdd y la variación de los géneros parasitarios en la población de montaña, mientras que la asociación detectada en la población del valle del Ebro fue moderada ($R^2 = 0,47$; $P=0,055$), debido principalmente a una relación directa entre Pdd y la abundancia relativa de *Teladorsagia sp.* (Beta=0,72; SE=0,30) e inversa con la abundancia relativa de *Trichostrongylus sp.* (Beta=-0,81; SE=0,30), lo que sugiere que la tolerancia o la resistencia al antihelmíntico difirió entre géneros.

El análisis de componentes de la varianza para la población de montaña, puso de manifiesto que sólo el 6,6% de la varianza total fue debida a la variación entre-meses, mientras que el 50,1% y el 43,3% se debió a la variación entre- e intra-muestreos respectivamente, siendo el SIC-95% estimado del 0,10. Por el contrario, para la población del Valle del Ebro, los componentes de la varianza estimados fueron 62,4%, 25,6% y 12%, respectivamente, cuando la variación debida a los cambios en la composición de géneros parasitarios no fue controlada en el análisis, mientras que fueron del 72,7%, 16,7% y 10,6% cuando esta variación fue eliminada de los componentes de varianza. Ello supuso un SIC-95% estimado del 0,16 en el primer caso y del 0,14 en el segundo. La representación (Fig. 1) de los valores mensuales medios de Pdd junto a su IC-95% (a partir del SIC-95%=0,16) muestra que los valores fueron claramente mayores en verano que en invierno, lo que sugiere que los valores observados de Pdd en esta población parasitaria variaron entre meses no sólo debido a la variación entre géneros y a la propia imprecisión del método, sino a otros factores no controlados en el presente estudio y que no están asociados a la resistencia antihelmíntica, lo que pone en duda la validez del EHA para cuantificar este fenómeno.

En la Figura 2 se ha representado el valor del SIC-95% estimado para diferentes combinaciones de diseño muestral. En el caso de la población del Valle del Ebro se utilizó el SIC-95% estimado tras controlar la variación debida a los géneros parasitarios. Como era de esperar, ambas gráficas difieren ligeramente en función de los datos de la población a partir de la que han sido calculadas, sin embargo se pueden inferir dos claras directrices. En primer lugar, la realización de un único muestreo con dos réplicas, tal y como recomienda la W.A.A.V.P. (Coles *et al.*, 1992), parece resultar insuficiente para cuantificar la resistencia antihelmíntica en una población parasitaria, pues la imprecisión del método conlleva un SIC-95% de 0,20, demasiado amplio como para detectar cambios con significación biológica en el fenómeno de la resistencia antihelmíntica. En segundo lugar, la obtención de mediciones con errores absolutos más pequeños parece sujeta a un gran esfuerzo de muestreo, de tal manera que, por ejemplo, para obtener un SIC-95% de 0,1 sería necesario realizar cuatro muestreos con, al menos, 2 réplicas del test cada uno en el caso de la población parasitaria con el Pdd más variable. Este escenario se complica en el caso de que los valores de Pdd varíen a lo largo del ciclo biológico anual (tal y como ha ocurrido en la población del Valle del Ebro). En ese caso, una simple estimación localizada en el tiempo no sería representativa del verdadero valor de Pdd de esa población parasitaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Coles et al., 1992. *Vet. Parasitol.* 44: 35-44. • von Samson-Himmelstjerna, G., et al., 2009. *Parasitol. Res.* 105: 825-834.

Agradecimientos: El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA_MEC RTA2010-00094-C03-01. Rebeca Calavia ha recibido una beca de formación de investigadores de tipo predoctoral de INIA.

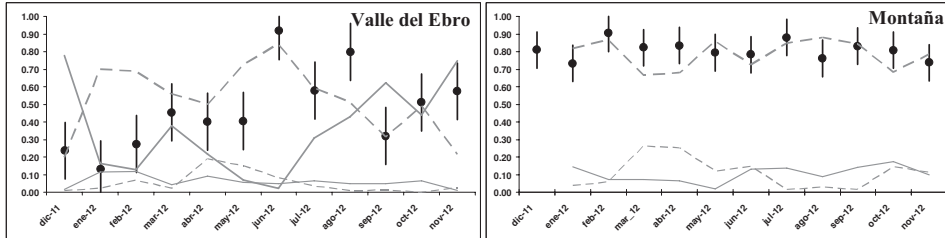


Figura 1. En negro, Pdd media mensual y su intervalo de confianza 95%. En gris, proporción media mensual de cada género parasitario: línea gruesa discontinua, *Teladorsagia sp.*; línea gruesa continúa, *Haemonchus sp.*; línea fina discontinua, *Chabertia sp.*; línea fina continúa, *Trychostrongylus sp.*

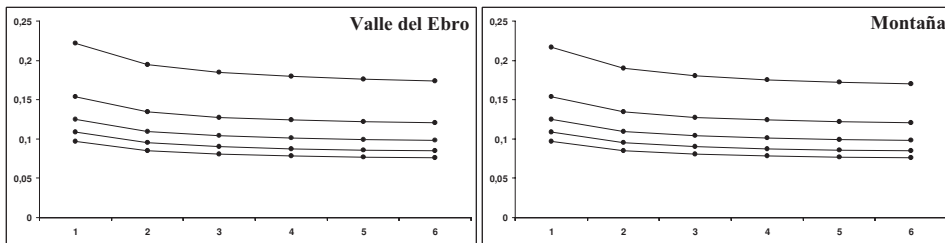


Figura 2. En el eje de ordenadas, precisión del EHA (medida como la amplitud del semi-intervalo de confianza del 95%) para cada una de las combinaciones de diseño muestral. En el eje de abscisas número de réplicas del ensayo dentro de un mismo muestreo. Las líneas horizontales representan combinaciones desde 1 (línea superior) hasta 5 muestreos (línea inferior).

PRECISION OF THE EGG HATCH ASSAY TO QUANTIFY ANTHELMINTIC RESISTANCE IN FIELD CONDITIONS

ABSTRACT: Benzimidazole resistance was monthly estimated in two natural sheep parasite populations during one year. Egg hatch assay (EHA) was used to estimate proportion (Pdd) of hatched eggs at a discriminant dose of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of thiabendazol after controlling by natural mortality. Every month, each population was sampled during three consecutive days, and EHA was replicated three times every day. Variance component analysis was performed to estimate precision of EHA (measured as length of the 95% confidence semi-interval, CSI-95%). Results showed that EHA was notably imprecise, since performing EHA with a single sampling with two replicates, such as it is advised by *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.)* yielded a CSI-95%=0.2, whereas four samplings with two replicates each or three samplings with five replicates each, were needed to reach a CSI-95% = 0.1. Monthly mean Pdd was modulated by variation in relative abundances of parasite genera but, also, by other confounding factors not controlled in the survey.

Keywords: anthelmintic resistance; benzimidazoles; egg hatch assay; sheep.

DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN OVINA POR *F. hepatica* MEDIANTE PCR Y DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN REBAÑOS INFECTADOS DE FORMA NATURAL

Robles-Pérez, D.¹, Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M.

¹Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 24071-León. mmarva@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una parasitosis de distribución mundial, que limita la producción ovina y bovina con consecuencias tales como pérdida de peso, disminución en el índice de conversión o reducción en la producción láctea.

El método tradicional para confirmar el diagnóstico de la fasciolosis es la demostración de huevos en heces mediante la técnica de sedimentación que es muy específica pero tiene el inconveniente de ser muy poco sensible. Por su parte, las técnicas basadas en la biología molecular son muy sensibles lo que constituye una gran ventaja. Recientemente, Martínez-Pérez *et al.* (2012) han desarrollado una PCR que permite detectar la infección por *Fasciola hepatica* a partir de la tercera semana post-infección (pi) y, mediante PCR anidada, a partir de la segunda semana, utilizando muestras de heces.

Para la detección de resistencias a los antihelmínticos (RA), se han descrito diferentes métodos *in vivo* e *in vitro*. Entre los primeros, destaca el test de reducción fecal de huevos (FECRT), basado en la reducción de huevos en heces después de un tratamiento antihelmíntico (Coles *et al.*, 1992). Respecto a los métodos *in vitro*, existe un test de reducción de coproantígeno (CRT), mediante un ELISA sandwich para la detección de antígenos de *F. hepatica* en heces antes y después de la administración del fármaco antihelmíntico.

Nuestro objetivo ha sido, en primer lugar, desarrollar una PCR basada en la detección del gen ribosomal "internal transcribed spacer 2" (ITS2) para el diagnóstico de la fasciolosis ovina; y, en segundo término, emplear esa técnica para detectar RA en rebaños infectados de forma natural a la vez que comparamos estos resultados con el FECRT y el CRT.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio, hemos empleado muestras de ADN fecal procedente de heces de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*. Se recogieron heces desde el inicio de la infección hasta la octava semana pi. Así mismo, se emplearon animales infectados de forma natural seleccionados al azar, procedentes de dos rebaños con un historial conocido de fasciolosis, localizados en Santillán de la Vega (SV) (Palencia), y Corullón (CR) (León).

Para el FECRT, las ovejas seleccionadas se dividieron en tres grupos de 7- 9 animales cada uno, que se trataron con albendazol (ABZ), clorsulón (CL) y triclabendazol (TCBZ). Las heces se recogieron de forma individual los días 0, 7, 15 y 30 post-tratamiento (pt) y se analizaron mediante sedimentación. El nivel de resistencia de cada grupo y del rebaño se calculó con la siguiente fórmula: % = [(media hpg día 0 - media hpg día pt)/media hpg día 0] x 100; hpg (huevos por gramo).

De acuerdo con las directrices de la WAAVP para tricostrongílidos (Coles *et al.*, 1992), hay RA cuando el porcentaje de reducción tras el tratamiento es < 90%; cuando está entre 90-95%, se sospecha la resistencia; y, si es > 95% la explotación sería susceptible.

Para la extracción del ADN fecal se emplearon 0,5 g de heces de cada oveja infectada de forma natural en los días 0, 7, 15 y 30 pt, mediante un kit comercial, "SpeedTools Tissue DNA Extraction Kit" (Biotools).

Para llevar a cabo la PCR se utilizó 12,5 µl de Taq DNA polimerasa Master Mix (2,0 mM de MgCl₂, 0,4 mM dNTPs y 0,05 unidades/µl de Taq polimerasa), 0,5 mM de primers y 4 µl de ADN diluido 1/10. Los cebadores se diseñaron en base a la secuencia GQ231547.1 de *F. hepatica* que codifica para la subunidad ITS2. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% TBE.

También se detectó la presencia de coproantígeno en heces en el rebaño SV los días 0, 7, 15 y 30 pt mediante el kit comercial "Bio-X bovine *F. hepatica* antigenic ELISA kit". Se consideraron positivas las muestras con una densidad óptica (DO) con un valor superior a 0,150 medidas a 450 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro estudio, hemos desarrollado una PCR para determinar la presencia de *F. hepatica* mediante la amplificación de un fragmento de 292 pb del gen ITS2. Mediante esta técnica, hemos podido detectar la infección por *F. hepatica* (infección experimental) a partir de la 2ª semana pi. Estos resultados están en concordancia con los de Martínez-Pérez *et al.* (2012), que también detectaron la infección en heces a la 2ª semana pi, aunque por medio de una PCR-anidada amplificando un fragmento de 423 pb de la oxidasa citocromo C1 (Cox1). En nuestro caso, el tiempo necesario es menor que el de la PCR-anidada. Una vez desarrollada la PCR para el diagnóstico de la infección, empleamos la técnica para detectar RA en animales infectados de forma natural. La PCR se llevó a cabo en rebaños tratados con ABZ, CLOR y TCBZ los días 0, 7, 15 y 30 pt. Para ambas cepas se confirmó una reducción en el número de animales positivos durante todo el estudio para cada fármaco, siendo todas las muestras negativas en el día 30 pt con TCBZ.

Los resultados obtenidos por PCR se compararon con el FECRT y el CRT. El número total de ovejas positivas por PCR respecto al número total de ovejas analizadas, así como el porcentaje de animales positivos para cada día pt, se recogen en la Tabla 1.

Hay que tener en cuenta que el ABZ y CLOR son eficaces frente a las fasciolas adultas pero no frente a los vermes inmaduros, y que el TCBZ elimina tanto inmaduros como adultos (Boray *et al.*, 1983). Tras realizar el FECRT, en ambos rebaños la resistencia al ABZ y CLOR frente a trematodos adultos se confirmó el día 7 pt con porcentajes de 50,1 y 74,9% en SV y 66,6 y 88,8% en CR, respectivamente. Los huevos presentes en las heces los días 15 y 30 pt podrían proceder de adultos resistentes y/o de fasciolas inmaduras que alcanzaron la madurez posteriormente. En cuanto al TCBZ, en el rebaño SV se confirmó la susceptibilidad frente a formas maduras e inmaduras, ya que la reducción de huevos fue mayor del 95% todos los días pt analizados. Sin embargo, en el rebaño CR, el día 7 pt la eficacia del TCBZ fue del 86,6% (frente a los adultos) haciendo sospechar resistencia a ese antihelmíntico, aunque los días 15 y 30 pt, la reducción fecal de huevos fue del 100% en ambos análisis. En los dos rebaños, el porcentaje de ovejas positivas fue mayor por PCR que por sedimentación, lo que confirma que la PCR es un método más sensible para el diagnóstico de la infección y por lo tanto para detectar la RA en los animales infectados.

Los resultados por PCR y FECRT se compararon con los obtenidos mediante un ELISA tipo sandwich en el rebaño SV. El número de ovejas positivas cada día de muestreo aparece en la Tabla 1. El valor medio de DO el día de tratamiento fue superior a 0,150 en todos los grupos y animales, confirmando que todos estaban infectados. Únicamente en los días 7, 15 y 30 pt con TCBZ, la media fue inferior a 0,150, considerándolas negativas. Comparando el porcentaje de animales positivos mediante PCR y ELISA sandwich, se observó que en el rebaño SV, después del tratamiento con ABZ, el porcentaje de animales positivos fue mayor el día 30 pt por PCR. Después de la administración de CLOR, todos los valores de animales positivos fueron semejantes (42,9%) por ambas técnicas. En cuanto al tratamiento con TCBZ, los porcentajes de ovejas positivas fueron mayores por PCR los días 7 y 15 pt (62,5 y 12,5%, respectivamente). Por lo tanto, se confirmó que la PCR desarrollada es más sensible que el ELISA tipo sandwich comercial para detectar la presencia de RA.

Se dio el caso que tras el tratamiento con TCBZ, en el día 7 pt uno de los animales fue positivo por sedimentación pero negativo por ELISA. La razón podría ser que los huevos del parásito también se pueden detectar en las heces como falsos positivos, debido a su presencia en la vesícula biliar hasta algunos días después de un tratamiento eficaz (Flanagan *et al.*, 2011).

Como conclusión, nuestros resultados permiten señalar que la técnica más sensible para detectar rebaños resistentes es la PCR, ya que el número de animales infectados por *F. hepatica* fue mayor por esta técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boray, J. *et al.*, 1983. *Vet. Rec.* 113:315-317.
- Coles, G.C. *et al.*, 1992. *Vet. Parasitol.* 44:35-44.
- Flanagan, A. *et al.*, 2011. *Vet. Parasitol.* 176:170-176.
- Martínez-Pérez, J.M. *et al.*, 2012. *Vet. Parasitol.* 190:80-86.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado el proyecto RTA 2010-00094-C03-02 (INIA). Martínez-Valladares disfruta de un contrato post-doctoral JAE-Doc del CSIC co-financiado por el Fondo Social Europeo.

Tabla 1. Número de animales positivos respecto al total para cada rebaño, fármaco y técnica y % de animales positivos. SED: Sedimentación.

Rebaños	Fármaco	Técnica	Día pt				% Animales positivos		
			0	7	15	30	7	15	30
SV	ABZ	SED.	7/7	4/7	6/7	3/7	57.1%	85.7%	42.9%
		PCR	7/7	7/7	6/7	6/7	100%	85.7%	85.7%
		ELISA	7/7	7/7	6/7	5/7	100%	85.7%	71.4%
	CL	SED.	7/7	3/7	2/7	2/7	42.9%	28.6%	28.6%
		PCR	7/7	3/7	3/7	3/7	42.9%	42.9%	42.9%
		ELISA	7/7	3/7	3/7	3/7	42.9%	42.9%	42.9%
	TCBZ	SED.	8/8	1/8	0/8	0/8	12.5%	0%	0%
		PCR	8/8	5/8	1/8	0/8	62.5%	12.5%	0%
		ELISA	8/8	0/8	0/8	0/8	0%	0%	0%
CR	ABZ	SED.	9/9	4/9	5/9	2/9	44.4%	55.6%	22.2%
		PCR	9/9	8/9	9/9	6/9	88.9%	100%	66.7%
	CL	SED.	8/8	2/7	4/8	1/6	28.6%	50%	16.7%
		PCR	8/8	5/7	7/8	4/6	71.4%	87.5%	66.7%
	TCBZ	SED.	8/8	2/8	0/5	0/6	25%	0%	0%
		PCR	7/7	8/8	2/5	0/6	100%	40%	0%

THE DIAGNOSIS OF OVINE FASCIOLOSIS BY MEANS OF A PCR AND ITS APPLICATION TO THE DETECTION OF ANTHELMINTIC RESISTANCE IN SHEEP FLOCKS NATURALLY INFECTED

ABSTRACT: The aim of this study was to develop a PCR based on the ribosomal internal transcribed spacer for the diagnosis of the infection by *Fasciola hepatica* in faeces of sheep. The infection could be detected from the second week post-infection in experimentally infected sheep after the amplification of a 292 bp fragment. On the other hand, this PCR was used to detect the anthelmintic resistance (AR) in sheep flocks naturally infected; these results were compared with other techniques such as the faecal egg count reduction test (FECRT) and the coproantigen reduction test (CRT). The FECRT was carried out in two flocks, Santillán de la Vega (SV) and Corullón (CR) in which the sheep were divided into three groups to be treated with albendazole (ABZ), clorsulon (CL) and triclabendazole (TCBZ). Faeces were individually collected on days 0, 7, 15 and 30 post-treatment (pt) for the detection of the number of eggs per gram (epg) in faeces, coproantigen measurement and DNA extraction. According to the FECRT, both flocks resulted resistant to ABZ and CL against adult flukes; in relation to the treatment with TCBZ, the flock SV was susceptible against all stages although the flock CR resulted resistant against adult flukes and susceptible against immature forms. To compare the FECRT and the PCR results, we calculated the percentage of positive animals each sampled day after treatment. For both flocks, the percentage of positive sheep was always higher by PCR than by sedimentation, thus confirming that the PCR is a more sensitive method to diagnose the infection and therefore to detect the resistance. On the other hand, the CRT was carried out by means of a sandwich ELISA kit in the flock SV. When comparing the percentage of positive animals between PCR and this ELISA we observed that, after the treatment with ABZ, the percentages of positive animals was higher on day 30 pt by PCR although after the administration of CLOR all percentages were the same by both techniques. Regarding the treatment with TCBZ, the percentages of positive sheep were higher by PCR on days 7 and 15 pt.

Keywords: *Fasciola hepatica*, PCR; FECRT; CRT.

EFFECTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON ANTIOXIDANTES (ACEITE DE LINO Y α -TOCOPHEROL) SOBRE LA FASCIOLISIS EXPERIMENTAL OVINA

Martínez-Pérez, J.M.¹, Robles-Pérez, D.¹, Benavides-Silván, J.², Morán-Lobato, L.², Rojo-Vázquez, F.A.^{1,2}, Andrés-Llorente, S.², Martínez-Valladares, M.²

¹Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 24071-León.

²Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). Finca Marzanas, 24346-Grulleros (León). mmarva@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una parasitosis muy común en los rumiantes domésticos, principalmente en los ovinos. El control se basa en la administración de fasciolicidas, pero su uso irracional ha favorecido el desarrollo de resistencias. Por ello, deben plantearse medidas alternativas, como la aplicación de estrategias profilácticas de carácter nutricional e inmunológico (Rehim *et al.*, 2003). Durante la infección por *Fasciola hepatica*, el hospedador activa mecanismos de defensa asociados a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) o prooxidantes (Maffei Facino *et al.*, 1993; Abo-Shousha *et al.*, 1999) que, en la fase crónica, causan daño hepático a nivel celular, reducen los niveles disponibles de antioxidantes no enzimáticos (glutación y vitaminas A, C y E) (Kolodziejczyk *et al.*, 2005) y mantienen un efecto inflamatorio. El uso de antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E (α -tocopherol) o de inmunomoduladores que regulen la respuesta inflamatoria, como los ácidos grasos omega-3 proporcionados por el aceite de lino (Mory *et al.*, 2004), pueden paliar los daños hepáticos. La suplementación de la dieta con estos compuestos podría ayudar a contrarrestar el efecto de las EROs, mejorar la calidad de la carne y aumentar su vida útil (Morrissey *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1997). El objetivo de este estudio ha sido analizar el efecto de la inclusión en la dieta de aceite de lino y de la vitamina E sobre la infección experimental con *F. hepatica* en ovejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El estudio se llevó a cabo con 30 ovinos de raza Merina de cinco meses de edad, procedentes de un rebaño libre de fasciolosis. Antes de comenzar el estudio, los animales se desparasitaron con triclabendazol + levamisol (Endex®), por vía oral. Los animales se distribuyeron en tres lotes con 10 animales cada uno, homogéneos según el peso corporal. Desde seis semanas antes del inicio del estudio hasta su finalización, los ovinos se alimentaron con una ración mixta idéntica, si bien al primer grupo se le suplementó la dieta con aceite de lino (3%); al segundo, con vitamina E (0,06 g/kg pienso); y al tercero no se le dio ningún aditivo (grupo testigo). Al inicio del ensayo, todos los ovinos se infectaron con 200 metacercarias de *F. hepatica* incluidas en cápsulas de gelatina. Todos los animales se sacrificaron el día 96 post-infección (p.i.) mediante la administración intravenosa de pentobarbital sódico (Dolethal). El experimento se llevó a cabo en el Instituto de Ganadería de Montaña de León.

Ensayos *in vivo* y parámetros bioquímicos

El peso vivo de todos los animales se midió al inicio y al final del ensayo.

Se recogieron muestras individuales de heces a partir del día 44 p.i. hasta el final del estudio, cada tres días. El recuento fecal de huevos se realizó mediante sedimentación, y el recuento acumulado se calculó según las especificaciones de Vercruyse *et al.* (1993).

Durante las semanas 0, 4, 8 y 12 p.i., se recogió individualmente sangre en tubos Vacutainer sin anticoagulante. El suero obtenido se congeló a -20°C y remitió al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León para valorar la actividad de las enzimas hepáticas gamma-glutamil transferasa (GGT) y alanino-amino transferasa (ALT).

Necropsia y análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Tras el sacrificio de los animales, se examinaron macroscópicamente el hígado y la vesícula biliar de cada animal y se tomaron muestras del lóbulo izquierdo para el estudio histopatológico. Posteriormente, se contaron las fasciolas presentes, clasificándolas según su tamaño. También se pesaron los hígados y los ganglios hepáticos linfáticos.

Los TBARS se realizaron a partir de tejido hepático, siguiendo las indicaciones de Maraschiello *et al.* (1999).

Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias significativas entre los tres grupos mediante la prueba ANOVA. Para determinar las diferencias entre pares de grupos se utilizó el análisis mediante la *t* de Student. Las diferencias menores al 5% ($P < 0,05$) fueron consideradas significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos *in vivo* y parámetros bioquímicos

Al final del ensayo, el grupo testigo presentó valores de peso vivo significativamente superiores ($P < 0,05$) frente a los otros dos grupos (Figura 1). En concreto, se observaron diferencias significativas entre el grupo testigo y el grupo suplementado con lino ($P < 0,01$) y entre este último y el grupo al que se administró vitamina E ($P < 0,01$).

La patencia comenzó el día 66 p.i. en el grupo suplementado con lino y en el testigo, y el día 70 p.i. en el grupo de la vitamina E (Figura 2). Tras analizar el recuento fecal acumulado de huevos al final del estudio, se pudo observar que el grupo del lino era superior ($841,3 \pm 663,4$ hgh) frente al testigo ($782,9 \pm 362,6$ hgh) y el de la vitamina E ($612,9 \pm 241,8$ hgh), aunque las diferencias no fueron significativas. Estos resultados indican un posible efecto de la vitamina E en la menor excreción fecal de huevos al comparar las eliminaciones entre grupos. Por otra parte, el efecto inmunomodulador del aceite de lino, debido a su alta concentración en ácidos grasos omega-3 (Mory y Beilin, 2004), se hace patente puesto que la eliminación fecal de huevos en este grupo fue menor que en el testigo hasta el día 90 p.i., en que la tendencia se invirtió; este hecho podría estar motivado por la inactivación del efecto inmunomodulador por los altos niveles de oxidación durante la Infección, puesto que los ácidos grasos poliinsaturados son atacados por la presencia de EROs.

Se evaluaron las enzimas hepáticas ALT y GGT, indicadoras de lesiones parenquimatosas y ductulares, respectivamente. La ALT estuvo dentro de los límites normales (7-24 UI/l) a lo largo del estudio, con valores máximos en 4ª semana p.i., coincidiendo con la migración del parásito, en los grupos del lino y de la vitamina E, aunque más elevados en el primero siendo las diferencias significativas ($P < 0,01$). Tras ello, tuvo lugar un descenso de los valores hasta finalizar el ensayo, siendo más importante en el grupo de la vitamina E (37,1%), frente al del lino (21,9%) y el testigo (12,1%). La GGT registró valores medios superiores a los normales (21-44 UI/l), con un incremento generalizado a medida que proseguía la infección. El mayor nivel de actividad enzimática se observó en el grupo del lino. También en la semana 4 p.i. se apreciaron diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,01$). Kolodziejczyk *et al.* (2005) relacionaron el aumento de enzimas indicadoras de daño hepático (en especial la ALT) en la fasciolosis con el descenso de los niveles de antioxidantes, con lo que el mayor descenso de esta enzima en el grupo de la vitamina E sugiere la protección frente a la infección.

Necropsia y análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los hígados de los animales se pesaron, comprobándose que el peso medio del grupo que recibió vitamina E era un 2,8% superior al del grupo testigo, y el suplementado con lino, un 13,3% inferior. En cuanto al peso de los ganglios linfáticos, el valor medio en el grupo de la vitamina E fue un 7,7% superior al testigo y en el grupo del lino un 7,7% inferior. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en ninguno de los análisis.

Tras el estudio de las lesiones macroscópicas del hígado tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre grupos. Histológicamente, la mayoría de las muestras mostraron hepatitis grave con componente inflamatorio mixto (linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos), sin diferencias entre los grupos.

El número medio de fasciolas recuperadas fue mayor en el grupo testigo ($123,0 \pm 35,2$) que en el de la vitamina E ($97,7 \pm 39,9$) y el lino ($71,2 \pm 26,5$), con diferencias significativas ($P < 0,01$). En el grupo testigo, las fasciolas tenían un tamaño mayor, con diferencias significativas entre este grupo y el del lino ($P < 0,01$).

Los resultados obtenidos en los TBARS mostraron que la suplementación de la dieta con vitamina E reducía de manera significativa ($P < 0,001$) los niveles de oxidación en hígado en comparación con la dieta testigo y la enriquecida con lino. La vitamina E, antioxidante lipofílico, es capaz de proteger las membranas frente a la acción de EROs y su

concentración se ve reducida como consecuencia de la infección por *F. hepatica* (Kolodziejczyk *et al.*, 2005). La suplementación con vitamina E limitó el nivel de peroxidación lipídica en el hígado tras la infección por *F. hepatica*, cuyo resultado fue una menor cantidad de fasciolas adultas. Los ácidos grasos presentes en el aceite de lino indujeron protección frente a la infección al reducir la carga parasitaria, actuar contra formas inmaduras y provocar una reacción inflamatoria menor (Casanueva *et al.*, 2001).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Shousha, S., Khalil, S.S. & Rashwan, E.A. 1999. J. Egypt. Soc. Parasitol. 29: 149-156.
- Casanueva, R., Hillyer, G.V., Ramajo, V., Oleaga, A., Espinoza, E. & Muro, A. 2001. J. Parasitol. 87: 697-700.
- Kolodziejczyk, L., Siemieniuk, E. & Skrzydlewska, E. 2005. Parasitol. Res. 96: 367-372.
- Maffei-Facino, R., Carini, M., Aldini, G., Ceserani, R., Ceserani, I., Cavaletti, E. & Vederio, L. 1993. Arzneimittelforschung. 43: 455-460.
- Maraschiello, C., Sárraga, C. & García-Regueiro, J.A. 1999. J. Agric. Food Chem. 47: 867-872.
- Rehim, W.M., Sharaf, I.A., Hishmat, M., el-Toukhy, M.A., Rawash, N.A. & Fouad, H.N. 2003. Arzneimittelforschung. 53: 214-220.
- Vercruyssen, J., Dorny, P., Hong, C., Harris, T.J., Hammet, N.C., Smith, D.G. & Weatherley, A.J. 1993. Vet. Parasitol. 49: 51-59.
- Wood, J.D. & Enser, M. 1997. Br. J. Nutr. 78, Suppl. 1: S49-S60.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Proyecto CSI185B11-2). M. Martínez-Valladares y J. Benavides disfrutaron de un contrato post-doctoral JAE-Doc del CSIC co-financiado por el Fondo Social Europeo y L. Morán-Lobato tiene concedida una beca JAE-Predoc del CSIC.

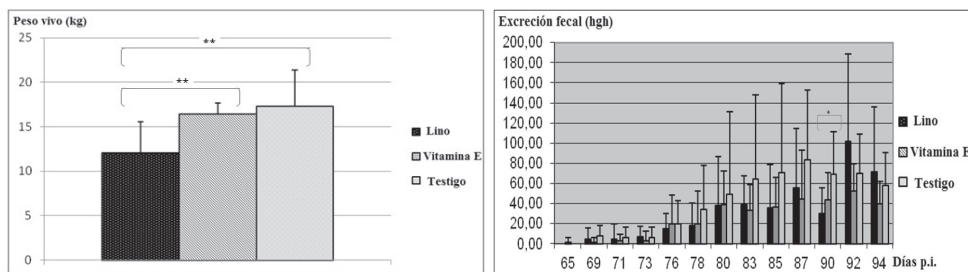


Figura 1. Peso vivo a lo largo del estudio. Las diferencias significativas están marcadas con ** ($P<0,01$). **Figura 2.** Cinética de excreción fecal de huevos (días 66-94 p.i.). Las diferencias significativas están marcadas con * ($P<0,05$).

EFFECT OF A DIET SUPPLEMENTED WITH ANTIOXIDANTS (FLAX OIL AND α -TOCOPHEROL) ON OVINE EXPERIMENTAL FASCIOSIS

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the effect of two different diets based on flax and vitamin E additives in comparison with a control group supplemented with a diet free of polyunsaturated fatty acids and phenolic compounds. Thirty sheep were divided in these three groups. Body weight (BW) and biochemical values (ALT and GGT hepatic enzymes) were studied. Faecal eggs excretion was also analysed and parasitic forms were collected and counted after measuring other hepatic ganglionar aspects. After analysing the analysis of variance (ANOVA) test, significant differences were found in relation to the BW ($P<0.05$) and the arithmethical mean of flukes recovered ($P<0.01$) with higher values in the control group, and in biochemical values during the week 4 postinfection ($P<0.01$) with upper enzymatic activities in groups supplemented with flax oil and vitamin E (α -tocopherol).

Keywords: flax oil, vitamin E (α -tocopherol), *Fasciola hepatica*, sheep.

TRATAMIENTO DE LA PARANFISTOMOSIS BOVINA

Suárez, J.L., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Romasanta, A., Miguélez, S., Sanchís¹, J., Francisco, R., Bonilla², R., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S.

Epidemiología y Zoonosis, Parasitología y Enfermedades parasitarias, Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 27002-Lugo (Spain). ¹Parasitología, Universidad de la República (Regional Norte), Salto (Uruguay). ²Laboratorios CARVAL COLOMBIA, Bogotá (Colombia). E-mail: mariasol.arias@usc.es.

INTRODUCCIÓN

La paranfistomosis es una trematodosis gastrointestinal causada por parásitos de la familia Paramphistomidae, que tienen un ciclo biológico similar a *Fasciola hepatica*, por lo que su presencia está asociada a ambientes húmedos, con abundante vegetación, temperaturas moderadas, que constituyen el hábitat idóneo para el hospedador intermediario. Como tal pueden actuar caracoles de los géneros *Bulinus*, *Glyptarissus*, *Indoplanorbis*, *Planorbis* y *Lymnaea*. La especie más habitual en Europa es *Calicophoron daubneyi*.

Los paranfistomos afectan con mayor frecuencia a rumiantes jóvenes, causando alteraciones digestivas y hemáticas que a veces pueden llegar a provocar la muerte de los animales. Existe evidencia de que estas alteraciones se deben principalmente a los trematodos juveniles, pero se discute la patogenicidad de los adultos (Rolfe *et al.*, 1991).

La importancia de esta trematodosis queda reflejada por las cuantiosas pérdidas económicas que se producen en industrias de lana, carne y leche. En algunos estudios se ha postulado que una de las causas responsables del incremento de vacas con paranfistomosis es la administración errónea de tratamientos fasciolicidas, mientras que no está muy extendida la utilización de productos de acción paranfistomicida.

Existen muy pocos productos eficaces frente a los trematodos Paramphistomidae. Hace algunos años se planteó el empleo de la oxiclozanida por su excelente actividad sobre estos parásitos (Paraud *et al.*, 2009). Este principio activo se comercializaba en un preparado junto con levamisol, bajo el nombre de Nilzan Plus[®] (Schering-Plough) pero actualmente no es posible conseguirlo en Europa. Se plantea el análisis de la eficacia de 4 compuestos, Albendazol, Netobimin, Oxiclozanida y Closantel en ganado vacuno de leche de 2 granjas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante 12 semanas se recogieron heces de 67 vacas Frisonas de 2 explotaciones lácteas localizadas en las provincias de A Coruña y Lugo, que previamente habían sido identificadas como infectadas por *C. daubneyi* al emplear la técnica copromicroscópica de sedimentación. Para analizar el efecto de los antihelmínticos, las vacas se dividieron en distintos grupos:

Granja 1

7 tratadas con Albendazol (Valbazen, Pfizer; 10 mg/kg peso vivo)

11 tratadas con Netobimin (Hapasil, Intervet-Schering Plough; 20 mg/kg peso vivo)

6 testigos sin tratamiento

Granja 2

13 tratadas con Closantel (Endoex, SP Veterinaria; 10 mg/kg peso vivo)

15 tratadas con Oxiclozanida (Nilzan, Schering Plough; 15 mg/kg peso vivo)

9 testigos

La eficacia de los tratamientos se estableció mediante el cálculo de los porcentajes de reducción de eliminación de huevos (IE1, Índice de Eficacia 1) y de animales que eliminan huevos (IE2, Índice de Eficacia 2):

$$\% \text{ IE1} = (1 - (\text{Media huevos}_{\text{pret-tratamiento}} / \text{Media huevos}_{\text{post-tratamiento}})) \times 100$$

$$\% \text{ IE2} = (1 - (\text{Vacas Positivas}_{\text{pret-tratamiento}} / \text{Vacas Positivas}_{\text{post-tratamiento}})) \times 100$$

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS 18 (Chicago, IL, USA) para Windows, empleando las pruebas de Kruskal-Wallis y "U" de Mann-Whitney.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las heces de los bovinos tratados con Albendazol o Netobimin, se observaron huevos de *C. daubneyi* durante todo el estudio (Fig. 1). Los rumiantes desparasitados con Oxiclozanida dejaron de eliminar huevos del trematodo 1 semana después del tratamiento, y los que recibieron Closantel se hicieron negativos a las 2 semanas post-tratamiento (Fig. 2). En los animales testigos (no tratados) de las 2 explotaciones eliminaron huevos durante todo el periodo de estudio.

En la Tabla 1 se puede apreciar que los valores más elevados para el IE1 (reducción de eliminación de huevos) se obtuvieron con la administración de Nilzan o Closantel, en tanto que con Albendazol o Netobimin los valores resultaron inferiores al 50%.

Un porcentaje de vacas próximo al 60% dejaron de eliminar huevos de *Calicophoron* en las heces tras la aplicación de Albendazol o Netobimin. Por el contrario, sólo 1 rumiante de los que recibieron Closantel, y otro tratado con Oxiclozanida continuaron resultando positivos tras la administración de los antihelmínticos.

Desde hace algunos años se viene observando un incremento en la prevalencia de parafistomosis, y el descenso de la de fasciolosis en ganado vacuno del Norte de España (Arias *et al.*, 2010; 2011), y entre las diferentes causas se baraja el diagnóstico coprológico incorrecto, que conduce a la administración de fármacos fasciolicidas ineficaces frente a los parafistomos. En el presente estudio se demostró que Albendazol o Netobimin no presentan eficacia suficiente sobre los trematodos gástricos, mientras que la Oxiclozanida ofrece los mejores resultados. El hallazgo de que el Closantel prácticamente iguala la eficacia de la Oxiclozanida es realmente útil teniendo en cuenta que actualmente se formula junto con el Levamisol, y que no es posible adquirirla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rolfe, P.F., Boray, J.C., Nichols, P., Collins, G.H. 1991. *Int J Parasitol.* 21: 813-819
- Paraud, C., Gaudin, C., Pors, I., Chartier, C. 2009. *Vet J.* 180: 265-267
- Arias, M., Piñeiro, P., Hillyer, G.V., Suárez, J.L., Francisco, I., Cortiñas, F.J., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva A, 2010. *J Parasitol.* 96: 626-631
- Arias, M., Lomba, C., Dacal, V., Vázquez, L., Pedreira, J., Francisco, I., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. 2011. *Vet Rec.* 168: 408-413.

Agradecimientos: Trabajo parcialmente financiado con los Proyectos de Investigación 10MDS261023PR (Xunta de Galicia, España) y AGL2012-34355 (Ministerio de Economía y Competitividad, España).

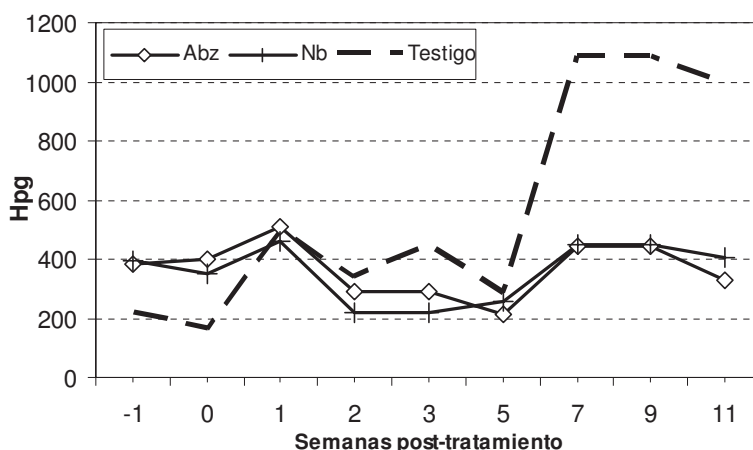


Figura 1. Cinética de eliminación de huevos de *C. daubneyi* en ganado vacuno tratado con Albendazol (Abz) o Netobimin (Nb).

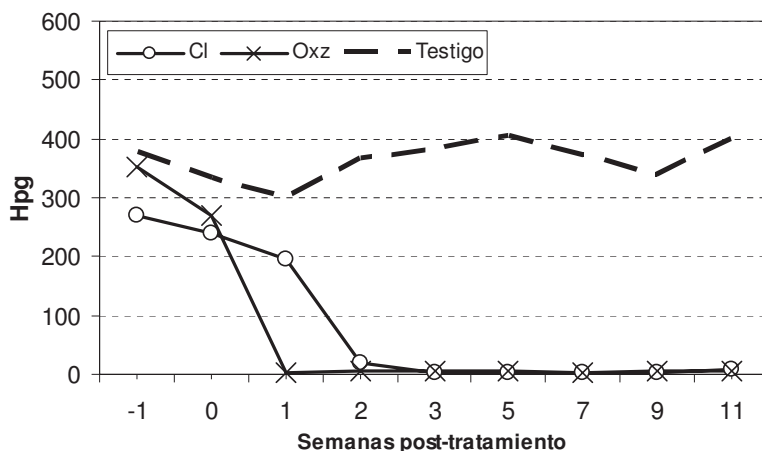


Figura 2. Cinética de eliminación de huevos de *C. daubneyi* en ganado vacuno tratado con Oxiclozanida (Oxz) o Closantel (Cl).

Tabla 1.- Valores para los Índices de Eficacia 1 (IE1) y 2 (IE2).

Spt	Abz		Nb		Cl		Oxz	
	IE1	IE2	IE1	IE2	IE1	IE2	IE1	IE2
0		0		0		0		0
1	0	29	0	27	18	23	99	93
2	27	57	38	45	92	85	98	93
3	27	57	38	45	98	92	98	93
5	46	29	26	55	98	92	98	93
7	0	0	0	27	98	92	99	93
9	0	0	0	27	98	92	98	93
11	18	0	0	27	97	92	98	93

TREATMENT OF BOVINE PARAMPHISTOMOSIS

ABSTRACT: The paramphistomicide activity of four anthelmintics among cattle naturally infected has been checked. Friesian bovines belonging to two farms were divided into six groups. Four bovine herds were given Albendazole, Netobimin, Closantel or Oxyclozanide, and two remained untreated as controls. The *Calicophoron daubneyi* egg-output was not suppressed after the administration of Albendazol or Netobimin. Closantel and Oxyclozanide provided the best results due to all the treated animals, Oxyclozanide suppressed the egg elimination as early as 1 week after treatment, and Closantel did it by 2 weeks. Nearly to 60% cattle dewormed with Albendazole or Netobimin were negative after therapy, while only 1 cow receiving Oxyclozanide and other treated with Closantel remained positive after treatment.

Key words: gastric fluke, cattle, deworming, closantel

UTILIZACION DE HONGOS PARASITICIDAS PARA EL CONTROL DE TREMATODOSIS EN GANADO BOVINO

Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Rodríguez, M.I., Oliver, A., Hernández, J.A., Fernández, M., Gómez, D., Arroyo*, F., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S.

Epidemiología y Zoonosis, Parasitología y Enfermedades parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Universitario, s/n, 27002-Lugo (Spain). * Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Div. Académica de Ciencias

Agropecuarias. E-mail: mariasol.arias@usc.es.

INTRODUCCIÓN

Entre las principales trematodosis parasitarias en rumiantes se encuentran fasciolosis, dicroceliosis y paranfistomosis (Rojo-Vazquez *et al.*, 2012). Mientras que las fases adultas de las dos primeras se localizan en el hígado, los paranfistómidos se encuentran en rumen y abomaso preferentemente. Estos 3 trematodos presentan un ciclo indirecto en el que participan 1 hospedador intermediario (*Fasciola*, *Paramphistomum*) ó 2 (*Dicrocoelium*). Otra diferencia se establece en el desarrollo de su fase externa, que requiere de medios húmedos con vegetación para *Fasciola* y *Paramphistomum*, y completamente contrarios (secano) en el caso de *Dicrocoelium*.

Las notables implicaciones de estas parasitosis sobre la salud de los animales y su productividad, han impulsado diferentes medidas para su control, aunque cabe resaltar que hoy por hoy el tratamiento de los animales constituye la principal y casi única opción. Este procedimiento está basado principalmente en la disponibilidad de un número importante de fármacos de contrastada eficacia, relativa facilidad de aplicación y actividad frente a los 2 estadios (inmaduros y adultos) presentes en el hospedador definitivo.

Se plantea un estudio con el objetivo de determinar la utilidad del empleo de hongos del suelo que desarrollan actividad frente a huevos de parásitos, como medida de prevención de trematodosis parasitarias en ganado bovino. Se trata de especies inocuas para la salud de los animales, que se encuentran presentes de forma habitual en el suelo salvo en aquellas extensiones en que desaparecen principalmente por actividades de laboreo agresivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Producción de esporas de *Mucor circinelloides*

A partir de muestras del suelo de pastos aprovechados por rumiantes se aislaron en el Laboratorio de Parasitología (Facultad de Veterinaria, USC) diferentes especies de hongos, y entre estas *Mucor circinelloides*. La propagación de este hongo se realizó en placas Petri, empleando medio de cultivo compuesto (por L de agua) por 20 g agar, 500 mg cloramfenicol y 25 g trigo autóctono.

Obtención de muestras de heces de bovinos parasitados por *C. daubneyi*

Se recogieron heces de vacas con una eliminación de 481 ± 67 (media \pm desviación estándar) huevos de *C. daubneyi* por gramo de heces, que se mezclaron con objeto de homogeneizarlas, y a continuación se colocaron 10 g en cajas de polietileno, que se llevaron a un prado para someterlas a condiciones ambientales naturales durante 52 días.

Análisis de la eficacia ovicida de *Mucor circinelloides*

Se prepararon 5 dosis de esporas, $2,5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ y $4 \cdot 10^5$, que se añadieron (vehiculadas en 5 mL) a un total de 120 cajas, en tanto que se mantuvieron 24 sin esporas como testigos. El número de repeticiones para cada dosis de esporas fue de 4.

A intervalos regulares se recogió el contenido de cada caja, que se procesó por sedimentación. Los huevos de *Calicophoron* observados se clasificaron en viables y no viables, de acuerdo a la clasificación propuesta por Lýsek *et al.* (1982).

Para cada caja, la eficacia se determinó mediante el cálculo de la reducción del número total de huevos de *C. daubneyi* viables en las heces mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción} = 1 - (\text{Huevos cajas hongos} / \text{Huevos cajas testigo}) \times 100$$

y finalmente se estimó la media para cada grupo (dosis de esporas añadidas).

Análisis estadístico

Se empleó el programa estadístico SPSS 18 (Chicago, IL, USA) para Windows. Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atendiendo a la clasificación de Lýsek et al. (1982), se estableció que *Mucor circinelloides* desarrollaba actividad de grado III, porque era capaz de romper la cubierta externa, penetrar en el interior y destruirlo (Figura 1).

El porcentaje de huevos de *C. daubneyi* que permanecieron viables a lo largo del estudio en el lote testigo osciló entre 63 y 81%. Al añadir las esporas de *M. circinelloides* la viabilidad de los huevos se redujo prácticamente al 50% en 18 días.

En la gráfica 1 se puede observar la dinámica de viabilidad de los huevos del trematodo gástrico en contacto con el hongo ovicida. El efecto más precoz se apreció con la dosis D3 ($1 \cdot 10^5$ esporas) a los 12 días.

Se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes con esporas y el testigo ($\chi^2 = 11,731$, $P = 0,039$). Por el contrario, no se observaron en relación a la dosis de esporas empleadas.

A los 52 días de la adición del hongo la viabilidad de los huevos de *C. daubneyi* era inferior al 30%.

El control de las trematodosis que afectan a los rumiantes requiere de la combinación de acciones sobre los parásitos cuando se encuentran en los hospedadores definitivos (desparasitación) y una vez se encuentran en el medio externo (suelo) (Rojo-Vázquez et al., 2012). El tratamiento de los animales conlleva algunas dificultades, puesto que resulta muy complicado sincronizar la administración de los fármacos al desarrollo de la fase externa de los parásitos. Esto lleva a que con frecuencia no sea posible interrumpir su ciclo, y el tratamiento de los animales resulta ineficaz. Un ejemplo que ilustra esta situación lo podemos encontrar en el control de trematodosis en ganado vacuno de leche, que sólo puede recibir tratamiento durante el periodo de secado (la opción de tirar la leche de animales tratados es una utopía), de modo que sólo se interrumpe una vez al año un ciclo que se completa en 3-4 meses en función de la época del año (Arias et al., 2010).

Se han establecido algunas medidas sobre el medio para intentar dificultar el desarrollo del ciclo de los trematodos. En primer lugar se ha centrado la actividad sobre los hospedadores intermediarios, procurando reducir su supervivencia modificando el hábitat de los caracoles (drenado de pastos, etc.) e incluso con molusquicidas. Este último aspecto ha resultado un tanto controvertido, y el riesgo de ecotoxicidad (toxicidad indiscriminada sobre diferentes organismos) ha limitado e incluso anulado su empleo. Más recientemente se ha indicado la utilidad de derivados de plantas como citral, ácido ferúlico o alicina para destruir los estadios larvarios de *Fasciola* que se encuentran en los limneidos (caracoles anfibios que actúan de hospedadores intermediarios) (Sunita y Singh, 2010).

Otras medidas se han dirigido a la destrucción de las formas libres de los trematodos o a sus fases infectivas, mediante la producción de estiércol con adecuada fermentación (para destruir los huevos), obtención de henos o ensilados que inactiven huevos o metacercarias; medidas preventivas como evitar el acceso a zonas de pasto encharcadas, o la realización de análisis coprológicos periódicos para monitorizar la infección de los animales.

En nuestra opinión, la aplicación de una acción efectiva sobre los huevos de trematodos presentes en heces podría constituir un elemento muy útil para reducir las posibilidades de infección de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios, y de este modo de los rumiantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lýsek, H., Faasatová, O., Cuero Pineda, O.N., Lorenzo Hernández, N. 1982. Folia Parasitol. (Praha) 29: 265-270
- Arias, M., Piñeiro, P., Hillyer, G.V., Suárez, J.L., Francisco, I., Cortiñas, F.J., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. 2010. J Parasitol. 96: 626-631
- Sunita, K., Singh, D.K., 2011. J Parasitol. Res. doi.org/10.1155/2011/240807
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M. 2012. Vet Parasitol. 189: 15-38.

Agradecimientos: Trabajo parcialmente financiado con los Proyectos de Investigación 10MDS261023PR (Xunta de Galicia, España) y AGL2012-34355 (Ministerio de Economía y Competitividad, España).



Figura 1. Huevo de *C. daubneyi* con hifas de *M. circinelloides* en su interior.

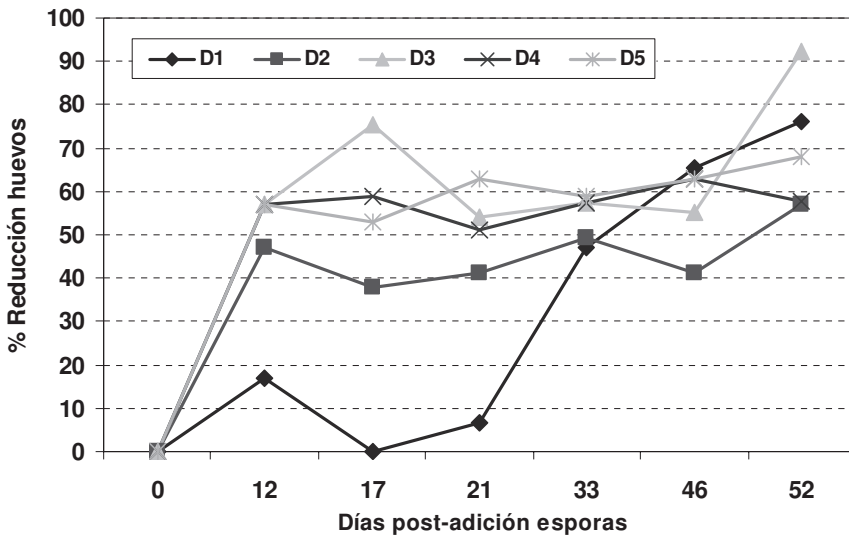


Figura 2. Valores del porcentaje de reducción de huevos viables de *C. daubneyi* en muestras de heces tratadas con esporas de *M. circinelloides*.

USE OF PARASITICIDE FUNGI FOR CONTROLLING BOVINE TREMATODOSES

ABSTRACT: The usefulness of parasiticide fungi for controlling trematodoses in bovine livestock has been analyzed. Spores of *Mucor circinelloides* were produced in Petri plates with wheat meal agar and then added to bovine fecal pats containing *C. daubneyi* eggs. Five doses were assayed, $2.5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ and $4 \cdot 10^5$ spores. A percentage of viable eggs ranging from 63% to 81% throughout the study was observed. The earliest reduction in the egg viability when using the D3 dosage was reached. The percentages of egg-viability reduced to 50% by 18 days after the treatment of the faeces. Statistically significant difference regarding the percentages of *C. daubneyi* eggs viability by using the Friedman test was demonstrated ($\chi^2 = 11.731$, $P = 0.039$). These differences were established among the control and the treated groups excluding the D1.

Key words: biological control, cattle, trematodoses, parasiticide fungi

EVALUACION DE UN MÉTODO COMBINADO DE CONTROL DE LA HEMONCOSIS OVINA BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Arroyo Balán, F^{1,4}, López Arellano, M², Liébano Hernández, E², Vázquez Prats, V², Ortiz de Montellano, A³, Arias Vázquez, MA⁴, Cazapal-Monteiro, C⁴, Mendoza de Gives, P².

¹ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Div. Académica de Ciencias Agropecuarias.

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), INIFAP. ³ Instituto Tecnológico de Chiná. Chiná, Campeche. ⁴ Epidemiología y Zoonosis, Parasitología y Enfermedades parasitarias, Fac. de Veterinaria, USC. E-mail:

leonardoaroba@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se está explorando la utilización de nuevas estrategias de control de las parasitosis gastrointestinales (Waller *et al.*, 1999). Las grandes desventajas del uso de productos químicos como los elevados costes, presencia de resistencia antihelmíntica (Koler, 2001) y su posible efecto nocivo para el medio ambiente, lleva a considerar la disminución de su empleo en la actualidad. Los hongos nematófagos son microorganismos del suelo que poseen la capacidad para desarrollar órganos especializados para capturar y destruir a los nematodos, para finalmente nutrirse de sus tejidos (Duddington, 1955). La especie que ha producido mejores resultados en el control de parásitos de rumiantes es *Duddingtonia flagrans*, porque produce una gran cantidad de clamidosporas resistentes a los procesos digestivos, que una vez administradas a los animales, se eliminan al ambiente junto con las heces, desarrollando y ejerciendo *in situ* su efecto depredador de nematodos (Mendoza *et al.*, 1998). Estudios recientes llevados a cabo en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET, INIFAP, México) han demostrado que de este modo es posible cortar el ciclo biológico de estos parásitos e impedir la diseminación de larvas infectivas en los potreros, lo que obviamente redundaría en la disminución de las posibilidades de reinfección de los animales (Ojeda *et al.*, 2005). El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización alternada de *D. flagrans* y Albendazol de uso comercial en la reducción de la población de larvas infectivas de *Haemonchus contortus* en cultivos fecales de corderos experimentalmente infectados con el parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del CENID-PAVET (INIFAP, Jiutepec, Morelos (México)). Se utilizaron 40 corderos de la raza pelibuey/Kathadin machos y hembras de 2-4 meses de edad en confinamiento, que recibieron una dosis inicial de 350 larvas de 3^{er} estadio (L₃) de *Haemonchus contortus* y tres re-infecciones de 175 L₃ a los 15, 45 y 75 días del inicio de los tratamientos. Los corderos fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos de 10 animales cada uno, el grupo 1 (Químico), fue tratado con 7,5 mg de Albendazol por kg de peso vivo a los 0, 30 y 60 días del experimento; el grupo 2 (Control Biológico) recibió por vía oral 1x10⁶ clamidosporas de *D. flagrans* / kg p.v. / día. En el grupo 3 (Combinado) se combinaron las 2 pautas anteriores (química + biológica). Para ello, se administró Albendazol (dosis mencionadas anteriormente) los días 1 y 60; este grupo también recibió clamidosporas de *D. flagrans* (1x10⁶ clamidosporas) diariamente entre los días 30 y 60. El grupo 4 se mantuvo como testigo y no recibió ningún tratamiento.

Durante 90 días se tomaron muestras de heces semanalmente directamente del recto para la cuantificación de huevos por gramo de heces (HPG). La recuperación y cuantificación de L₃ se llevó a cabo mediante la realización de coprocultivos. Los resultados se analizaron por el procedimiento de Modelos Lineales Generalizados (MLG), ANOVA para un modelo de mediciones repetidas y la comparación de tratamiento se realizó con la prueba de comparación múltiple de SIDAK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del HPG al análisis estadístico (P<0,05) mostraron que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos Químico y Combinado (Tabla 1). De igual forma, tampoco se

observaron diferencias entre el grupo de Control Biológico con respecto al grupo Testigo. En relación con las larvas, los tres grupos (Químico, Control Biológico y Combinado) resultaron significativamente diferentes al Testigo (Tabla 2) ($P < 0,05$). Los resultados de la reducción de la población larvaria en los cultivos fecales por acción de los diferentes tratamientos alcanzaron valores del 91, 69 y 79% para los grupos Químico, Control Biológico y Combinado, con respecto al grupo Testigo.

Los resultados del presente estudio muestran que el grupo Químico fue el que tuvo la mayor eficacia en cuanto a la disminución de HPG, obteniéndose una reducción de HPG del 94%, dentro de los límites aceptables (Bowman y Lynn, 2004). No se encontró diferencia en la acción de los tratamientos sobre el número de larvas, lo que concuerda con otros estudios (Paraud *et al.*, 2004). La utilización del control Biológico no tuvo efecto sobre el porcentaje de reducción de HPG, en coincidencia con resultados anteriores (Ojeda *et al.*, 2005), ya que este método no afecta a los parásitos que se encuentran en los animales, sino que su efecto consiste en capturar, destruir y alimentarse de las fases larvarias de los nematodos en las heces.

Los resultados de la presente investigación muestran que la utilización de *D. flagrans* en forma combinada con un antihelmíntico convencional proporciona un efecto muy beneficioso, dado que se consigue reducir la población parasitaria en los hospedadores y en el suelo. De este modo, también se logra reducir el riesgo de infección de los animales, y con ello, la utilización de antiparasitarios químicos, lo que redundaría en el ahorro de los costes de producción, disminución de la presencia de residuos en el medio ambiente y de la aparición de cepas parasitarias con resistencia a antihelmínticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bowman, D.D., Lynn, R.C. 2004. Georgis Parasitología para veterinarios. Octava edición. Editorial Elsevier. Madrid, España. Pp 166
- Duddington, C.L. 1955. Bot Rev. 21: 377-439
- Köler, P. 2001. Int J Parasitol. 31: 336-345
- Mendoza de Gives, P., Flores Crespo, J., Herrera Rodríguez, D., Vázquez Prats, V., Liébano Hernández, E., Ontiveros Fernández, G.E. 1998. J Helminthol. 72: 343-347
- Ojeda-Robertos, N., Mendoza de Gives, P., Torres Acosta, J.F., Rodríguez Vivas, R.I., Aguilar-Caballero, A.J. 2005. J Helminthol. 118: 61-69
- Paraud, C., Pors, I., Chartier, C. 2004. Small Ruminant Res. 55: 199-207
- Waller, W.P. 1999. Int J Parasitol. 29: 155-164.

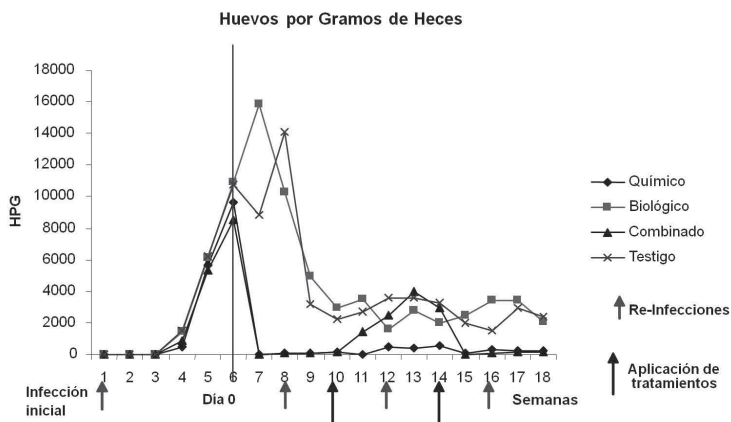


Figura 1. Promedio de huevos por gramo de heces (HPG).

Tabla 1. Promedios y errores estándar del número de huevos por g de heces (HPG) y de larvas obtenidas a partir de cultivos fecales (Larvas).

Variables	Grupos			
	1 Químico	2 Control Biológico	3 Combinado	4 Testigo
HPG	216,6 ± 32,9	4615,4 ± 567,3	980,3 ± 284,5	3646,76 ± 512,40
LARVAS	11,8 ± 2,17	41,2 ± 8,50	28,3 ± 6,88	132,6 ± 33,09

Tabla 2. Porcentajes de reducción del número de huevos por g de heces y de Larvas obtenidas a partir de cultivos fecales.

Variables	Grupos		
	1 Químico	2 Control Biológico	3 Combinado
HPG	94%	0	73%
LARVAS	91%	69%	79%

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SAGARPA-CONACYT (México).

EVALUATING A COMBINED METHOD OF CONTROL OF THE OVINE HAEMONCHOSIS UNDER CONTROLLED CONDITIONS

ABSTRACT: The aim of this research was to evaluate the efficacy of a combined method of parasitic control, with albendazole and *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in *Haemonchus contortus* artificially infected sheep. Forty *H. contortus*-infected sheep were used. This experiment was carried out in a 90-day period. Sheep were randomly divided into four groups of 10 animals each and received the following treatments: Group 1, albendazole at 7.5 mg/kg at days 0, 30 and 60; Group 2, received an oral treatment with 1×10^6 *D. flagrans* chlamydospores per kilogram; Group 3 received a combined treatment: albendazole was orally administered twice, at days 1 and 60 at the previously mentioned dose, and was also orally treated with *D. flagrans* chlamydospores everyday from day 30 to day 60 at the same dose than group 2; Group 4 (control group). Results showed a high anthelmintic efficacy (91%) for albendazole; meanwhile, the biological and the combined methods resulted in 69 and 79% larval reduction in fecal cultures; respectively and the three groups showed statistic differences with respect to the control group. The combined method using albendazole and *D. flagrans* chlamydospores is a promissory alternative against the ovine haemonchosis.

Keywords: Albendazole, *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*, sheep

SOLUCIONES SOSTENIBLES PARA LA PREVENCIÓN DE PARASITOSIS EN GANADO VACUNO EN REGIMEN ECOLÓGICO

Arias, M.S., Francisco, I., Cazapal-Monteiro, C., Hernández, J.A., Gómez, D., Fernández, M., Cortiñas, F.J., Suárez, J.L., 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: mariasol.arias@usc.es.

INTRODUCCIÓN

La ganadería ecológica establece que los animales han de mantenerse el mayor tiempo posible en sistemas de pastoreo extensivo para alimentarse directamente del forraje, salvo cuando su escasez requiere suplementación con paja o concentrados. Las principales enfermedades parasitarias del ganado en pastoreo están provocadas por helmintos (trematodos y nematodos, fundamentalmente) (Arias *et al.*, 2011).

La administración de tratamientos basados en bencimidazoles, lactonas macrocíclicas o sales de pirantel consigue reducir la carga de formas parasitarias que se encuentra en el hospedador definitivo, por lo que las posibilidades de reinfección con fases infectivas que se encuentran en el suelo son elevadas. Otro de los inconvenientes que presentan es el riesgo de aparición de residuos de productos químicos en alimentos de origen animal. Debido a su metabolización y eliminación a través de las heces, también pueden resultar perjudiciales para algunos insectos coprófagos, lo que afecta a la degradación del estiércol y de este modo a la fertilización del suelo.

Ante esta situación, urge el desarrollo de nuevos procedimientos. Entre las posibilidades más recientes se han indicado algunas pautas de control biológico, basadas en la administración de esporas de los hongos. En el presente estudio se analizó la posibilidad de emplear una mezcla de esporas de *Mucor circinelloides* y *Arthrobotrys flagrans* para el control biológico de parásitos que afectan al ganado vacuno en sistemas de producción ecológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras de heces de bovinos parasitados

El presente estudio se desarrolló en 2 explotaciones de ganado vacuno en pastoreo, PRODEME (Pro Deficientes Mentales) localizada en Monforte de Lemos (Lugo) y Guntín (Lugo). Se recogieron heces directamente del recto de 20 animales/explotación, que se analizaron mediante flotación, sedimentación y migración larvaria.

Una vez establecido el diagnóstico parasitológico, para cada animal se distribuyeron aproximadamente 40 gramos de heces en cajas de plástico (5 g/caja).

Producción de mezcla de esporas de *Mucor* + *Arthrobotrys*

Se empleó el medio de cultivo líquido COPFr para la obtención de esporas de los hongos *Mucor circinelloides* (ovicida) y *Arthrobotrys flagrans* (larvicida) (Fig. 1). Se trata de un medio compuesto (por L de agua) por 7,1 g NaCl, 1,6 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,423 mg proteína FhrAPS (proteína recombinante de *Fasciola hepatica*) y 30,6 gramos trigo autóctono (*Triticum aestivum*).

Eficacia del combinado fúngico

Con objeto de determinar el efecto de las esporas de hongos sobre las formas parasitarias presentes en las heces de los vacunos, se añadieron 3 mL de una mezcla de 3,2 10⁵ esporas de *M. circinelloides* + 3,2 10⁵ esporas *A. flagrans*. Para cada animal, se prepararon 6 cajas con hongos y se mantuvieron 2 como testigos.

Transcurridos 30 días se evaluó en cada caja el efecto del hongo mediante el cálculo de la reducción de la presencia de formas parasitarias en las heces:

% Reducción= 1 – (Huevos cajas hongos / Huevos cajas testigo) x 100

y finalmente se estimó la media para cada grupo (especie animal).

Análisis estadístico

Se empleó el programa estadístico SPSS 18 (Chicago, IL, USA) para Windows. Los resultados obtenidos se analizaron con la “U” de Mann-Whitney.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de las muestras fecales de los bovinos de Guntín mostró la presencia de ooquistes de coccidios (375 ± 105) (media \pm desviación estándar) y de huevos de *Calicophoron daubneyi*. Después de añadir la mezcla de clamidosporas se obtuvo un porcentaje de reducción de huevos del trematodo del 65-86% (Tabla 1).

En las heces de las vacas de PRODEME se encontraron ooquistes de coccidios (250 ± 55) y huevos de nematodos gastrointestinales (estrongilados). Después de añadir la mezcla de clamidosporas se obtuvo un porcentaje medio de reducción de larvas 3 del 96-98% (Tabla 2).

La explotación de animales en sistemas ecológicos obliga a tener en cuenta que, a criterio del profesional veterinario, podrán instaurarse tratamientos farmacológicos (máximo 2/año, y 1/año para ciclos productivos inferiores a 12 meses), para continuar comercializando los productos bajo el indicativo *ecológico*, observándose en todo caso los periodos de supresión estipulados. Esta restricción (prohibición) del uso de productos farmacológicos para el control de los parasitismos lleva a la aplicación de diferentes procedimientos como la rotación de pastos o la alternancia de especies animales en las praderas, siendo más reciente la introducción de la homeopatía (García Romero *et al.*, 2002).

Ante esta situación, cabe la posibilidad de desarrollar pautas de control biológico, basadas en el empleo de organismos no modificados presentes de forma natural en el suelo, formando parte de la biota telúrica. Un ejemplo lo constituyen algunos hongos que tienen actividad parasiticida (Arias *et al.*, 2012). Mientras que se conoce la actividad de *Arthrobotrys flagrans*, hongo capaz de eliminar las larvas de nematodos presentes en el suelo (Mendoza *et al.*, 2006), apenas existe información del empleo de *Mucor circinelloides* para destruir los huevos de formas parasitarias presentes también en el suelo. En ambos casos, cuando las esporas se ponen en contacto con las formas parasitarias (huevos, larvas), comienzan su desarrollo. *Mucor* ejerce una actividad de presión sobre la cubierta de los huevos, y con la cooperación de diversos enzimas liberados, provoca su ruptura (Lýsek *et al.*, 1987). *Arthrobotrys* elabora trampas en su micelio, que atrapan a las larvas de los nematodos estrongilados y finalmente las destruyen. En ambos casos se trata de asegurarse las necesidades de nitrógeno y de carbohidratos.

La posibilidad de producir de forma conjunta clamidosporas de hongos con actividad complementaria constituye un mecanismo muy útil para prevenir y controlar los parasitismos que causan trematodos y nematodos parásitos en ganado vacuno en sistemas ecológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lýsek, H., Krajčí, D. 1987. Folia Parasitol. (Praha) (34): 57-60
- García-Romero, C., Corchero, J., Valcárcel, F., Rojo-Vázquez, F.A. 2002. Ovis 80: 63-72
- Mendoza-De Gives, P., Zapata Nieto, C., Hernández, E.L., Arellano, M.E., Rodríguez, D.H., Garduño, R.G. 2006. Ann N Y Acad Sci. 1081: 355-359
- Arias, M., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Piñeiro, P., Francisco, R., Cazapal-Monteiro, C., Cortiñas, F.J., Francisco, I., Romasanta, A., Paz-Silva, A. 2011. Livestock: Rearing, Farming Practices and Diseases, Nova Science Publishers, Hauppauge NY
- Arias, M., Suárez, J., Cortiñas, F.J., Francisco, I., Suárez, J.L., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. 2012. Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease, Nova Science Publishers, Hauppauge NY.

Agradecimientos: Trabajo parcialmente financiado con los Proyectos de Investigación 10MDS261023PR (Xunta de Galicia, España) y AGL2012-34355 (Ministerio de Economía y Competitividad, España).

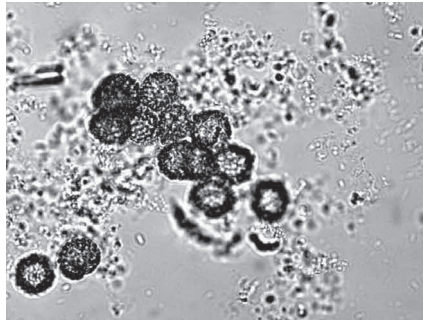


Figura 1. Esporas de los hongos *M. circinelloides* y *A. flagrans* producidas en medio líquido de cultivo.

Tabla 1.- Efecto de una mezcla de esporas de *M. circinelloides* y *A. flagrans* sobre los huevos del trematodo gástrico *Calicophoron daubneyi* en heces de ganado vacuno.

Hpg inicial	% Reducción
<200 (n = 8)	86
200 – 500 (n = 7)	65
> 500 (n = 5)	66

Tabla 2.- Efecto de una mezcla de esporas de *M. circinelloides* y *A. flagrans* sobre larvas L3 de nematodos estrogilados en heces de ganado vacuno. L3 Af: recuento de larvas L3 en cajas con esporas de *A. flagrans*.

Hpg inicial	L3 Testigo	L3 Af	% Reducción	Mann-Whitney
<100 (n= 9)	52	1	98 (91 - 100)	U= -2,049 P= 0,040
100 - 300 (n= 5)	168	7	96 (88 - 100)	U= -2,054 P= 0,039
>300 (n= 6)	269	12	96 (90 - 100)	U= -2,012 P= 0,044

SUSTAINABLE APPROACHES FOR THE PREVENTION OF PARASITIC INFECTION AMONG BOVINE LIVESTOCK UNDER ORGANIC REARING

ABSTRACT: The goal in the current work was to assess the possibility of the biological control of parasites affecting bovine livestock under organic rearing. Spores belonging to *Mucor circinelloides* and *Arthrotrrys flagrans* were jointly produced in a submerged culture. The efficacy of this mixture was determined against trematode eggs (*Calicophoron daubneyi*) and nematode larvae (strongyles). Fecal samples were collected from grazing cattle into two farms (20/each farm) and divided into 5 g batches.

In the fecal pats receiving the fungal mixture, the viability of *C. daubneyi*-eggs reduced to 14-35%, while 2-4% of L3 strongyles were retrieved. These results underline the usefulness of a fungal blend against parasites affecting cattle maintained under organic systems.

Key words: organic rearing, cattle, biological control, parasiticide fungi

MONITOREO NACIONAL DE LA NOSEMOSIS - RESULTADOS PREVIOS DEL PROYECTO PORTUGAL, APICULTURA Y NOSEMA

Pires-Sância M.A.¹, Murilhas, A.M.², Almeida, P.R.³, Valério M.J.⁴

¹ Centro de Investigação de Montanha (CIMO)/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal; spires@ipb.pt

² Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Évora, Portugal;

³ Departamento de Zootecnia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal;

⁴ Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Departamento de Patologia, Sector de Patologia Apícola, Lisboa, Portugal

INTRODUCCIÓN

La nosemosis es una enfermedad de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.), cuyo agente etiológico tradicional (*Nosema apis* Zander) se identificó hace un siglo (Paxton, 2010). Considerada una de las enfermedades más frecuentes y perjudiciales para las abejas occidentales, ha sido intensamente estudiada (aunque no siempre es clara, se enfrenta a unos síntomas relativamente inespecíficos o no aparentes). El *Nosema apis* (Na) hasta principios de 1990, fue considerado el único agente causal de Nosemosis en las colonias de abejas en Europa (Klee *et al.* 2007). Sin embargo, en 1994, una nueva especie de *Nosema* (el *Nosema ceranae* Nc) fue identificado y descrito en la abeja asiática (*Apis cerana*) por Fries *et al.* (1996).

En Europa occidental, la primera detección de colonias de abejas con Nc se hizo en España en 2005 (Higes *et al.*, 2006). En la última década, su expansión ha sido rápida y con frecuencia ha surgido asociado con el síndrome de colapso de las colmenas (SCC, o CCD en terminología anglosajona). Actualmente, el *Nosema* emerge como uno de los agentes etiológicos con mayor incidencia en Portugal. Este hallazgo, unido al desconocimiento del tipo(s) de *Nosema* en el país, es una de las razones que justifican la realización de este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 277 muestras de abejas adultas fueron recogidas a la entrada de la piquera, en los colmenares seleccionados según la información recogida por entrevista telefónica (mediante un cuestionario básico "Coloss") realizado a un millar de apicultores. Estas muestras fueron registradas, etiquetadas y almacenadas el día de la cosecha, según protocolo aprobado por el equipo del proyecto. Posteriormente fueron congeladas hasta su procesamiento. La evaluación inicial se llevó a cabo mediante microscopía óptica utilizando un método cualitativo recomendado en el Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal en los animales terrestres (OIE, 2008). Los abdómenes de 60 abejas se maceraron en un mortero con 5 ml de agua destilada. A continuación una gota de esta suspensión se observa por microscopía de campo claro o de contraste de fase (400x). Las esporas se destacan como corpúsculos ovoides, refringentes, brillantes y oscuros rodeados por una membrana.

Los datos fueron analizados utilizando el software R (Core Team, 2012). Los resultados del análisis se presentan en las tablas de contingencia que contienen frecuencias absolutas y relativas (%), a las proporciones de casos positivos y negativos identificados por regiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 227 muestras fueron procesadas por microscopía óptica. Apenas en una muestra fue diagnosticada acarapodosis, correspondiendo al 0,4% de las muestras positivas detectadas. (Tabla 1). El análisis microscópico confirmó la prevalencia de nosemosis, pero también de otras enfermedades de las abejas adultas, como varroosis, apimiasis y acarapodosis, en el monitoreo nacional realizado en otoño del año 2011.

De las muestras analizadas, el mayor porcentaje correspondió a muestras negativas, excepto en relación al diagnóstico de nosemosis cuya frecuencia de muestras positivas fue mayor (50,9%). El promedio de casos positivos detectados en laboratorio reveló que la presencia de nosemosis se manifiesta en todas las regiones de Portugal continental. Sin

embargo, hay que resaltar una prevalencia más baja de nosemosis (20%) y varroosis (5%) en la región del Algarve (Tabla 2). La frecuencia de apimiasis fue mayor en la región de Lisboa, aunque en general, se presentó baja (del orden de los 10%). Estos datos son consistentes con los encontrados por Pires *et al.* (2011), que muestran una baja prevalencia de apimiasis diagnosticada en un muestreo nacional realizado en el año 2009.

Estos datos sugieren, que los apicultores de la región del Algarve realizan, posiblemente, una gestión sanitaria más adecuada de sus colmenares, haciendo la prevención de estas enfermedades, principalmente de la varroosis, de una forma más planificada, lo que podrá contribuir para una menor frecuencia de las enfermedades. Podrán, sin embargo, contribuir otras causas a la explicación de estos resultados, como por ejemplo, las diferentes características del suelo y vegetación asociadas al clima de la región sur del país. En consecuencia, es necesario investigar también posibles correlaciones con otros datos obtenidos en este proyecto, que puedan ayudar a sostener las razones de estas diferencias. Así, los resultados obtenidos indican la presencia del agente etiológico *Nosema spp.* en algunos colmenares de todos los distritos del territorio continental de Portugal, resultando que, un 50,9% de las explotaciones apícolas totales estudiadas tenían nosemosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Core Team. 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0. (<http://www.R-project.org/>).
- Fries, I., Feng, F., Silva, A. D., Slemenda, S. B., Pieniasek, N. J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honeybees *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32: 356-365.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92: 93-95.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanatti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kriger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, J., Paxton, R.J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *N. ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 96: 1-10.
- OIE, Terrestrial Manual 2008. Nosemosis of honey bees. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010, Chapter 2.2.4., pp. 410-414.
- Paxton, R. J. 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honeybees (*Apis mellifera*)? J. Api. Res. 49: 80-84.
- Pires, S. M. A., Cadavez, V., Valério, M. J. 2011. Prevalence and geographical distribution of *Senotainia tricuspis* (Meigen). In: Diagnosis and control of bee diseases OIE Symposium, September 19 and 20, 2011, Buenos Aires, Argentina.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Instituto de Financiamento para la Agricultura y la Pesca (IFAP) en el ámbito del Programa Apícola Nacional (proyecto, PAN). Tampoco se podría haber llevado a cabo sin la ayuda de todas las asociaciones y cooperativas de apicultores e instituciones que han colaborado al ofrecer información sobre los apicultores. Ni tampoco a todos los apicultores que han contribuido amablemente en los cuestionarios o en el muestreo.

Tabla 1. Número de muestras positivas y su prevalencia (%) para cada enfermedad diagnosticada en el período de estudio

Enfermedades	Muestras positivas	
	Número	%
Nosemosis	141	50,9
Varroosis	77	27,8
Acarapidosis	1	0,4
Apimiasis	36	13,0
Total de muestras	277	

Tabla 2. Porcentaje (%) de muestras positivas obtenidas por regiones en el período de estudio

Regiones	N	Nosemosis		Varroosis		Apimiasis	
		(%)	n	(%)	n	(%)	n
Norte	70	60,0	42	32,9	23	10,0	7
Centro	90	51,1	46	33,3	30	11,1	10
Lisboa	16	25,0	4	31,2	5	62,5	10
Alentejo	81	55,6	45	22,2	18	8,6	7
Algarve	20	20,0	4	5,0	1	10,0	2

N = Número total de muestras; n = número de muestras positivas por regiones

PORTUGAL, BEEKEEPING AND NOSEMA PROJECT – PRELIMINARY RESEARCH OF NOSEMA

ABSTRACT: Considering the growing number of reports implicating *Nosema ceranae* in colony morbidity/mortality, it is relevant to clarify the current epidemiology of Nosemosis in Portugal beekeeping context, pinpointing the etiologic agents to the species level and, eventually, identifying possible intra-specific types. About 2% of the registered Portuguese apiaries were sampled in two consecutive years (2011 and 2012). Apiaries were grouped according to their Nosema status (presence or absence of Nosema spores) by light microscopy methodology. Preliminary research of Nosema in samples collected at national level in the autumn of 2011, it becomes the objective of the present study. Laboratory diagnosis made by optical microscopy revealed the prevalence of nosemosis, but also other adult bee diseases, such as, varroosis, acarapidosis and apimyiasis. The results show the presence of the pathogen Nosema spp. in all regions of mainland Portugal and that, its prevalence is higher in the North, Centre and Alentejo regions. The varroosis presented a lower prevalence at the Algarve (5.0%) comparatively to all other regions of mainland Portugal. Regarding the acarapidosis disease, only one case was diagnosed in the central region of Portugal (sub-region Dão-Lafões).

Keywords: honey bee, nosemosis, diagnostic techniques, pathology

LOS FLEBOTOMOS (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) ASOCIADOS A LAS EXPLOTACIONES DE RUMIANTES EN ESPAÑA Y SU INTERÉS SANITARIO

Lucientes, J.¹, Estrada, R.¹, Salido, V.¹, Oropeza, V.¹, Miranda, M.A.², Pagés, N.³, Molina, R.⁴, Sánchez-Murillo, J.M.⁵, Delacour, S.¹, Ruiz-Arrodo, I.¹, Pinal-Prieto, R.¹, Alarcón-Elbal, P.M.¹, Castillo-Hernández, J.A.¹.

¹Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. ²Universidad de las Illes Balears. ³CReSA Barcelona. ⁴Instituto de Salud Carlos III Madrid. ⁵Laboratorio Regional Pecuário Badajoz. jlucien@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Las explotaciones de rumiantes presentan asociada una numerosa fauna entomológica propia. Unas veces aprovechando como medio de cría los desechos orgánicos que producen (heces, cadáveres), otras veces son los propios animales recurso importante de alimento ya sea sus exudados o la sangre que pueden extraer de ellos, o por las dos conjuntamente, como hábitat de cría y fuente de alimentación.

Dentro de esta fauna, en los últimos años han tomado especial importancia en Veterinaria algunos dípteros hematófagos por su capacidad para la transmisión de enfermedades. Nos estamos refiriendo a los dípteros de la Familia Ceratopogonidae y género *Culicoides* que son los vectores de dos enfermedades que han sido emergentes en la última década en nuestro País, la enfermedad de la Lengua Azul y la producida por el virus Schmallenberg. El grupo de dípteros hematófagos es muy amplio y entre los presentes en las explotaciones de rumiantes en España encontramos la Familia Psychodidae, Subfamilia Phlebotominae denominados flebotomos o flebotominos. Esta subfamilia tiene dos géneros que se pueden encontrar en España, *Sergentomyia*, que tienen escaso interés veterinario pues se alimentan de reptiles y son vectores de parásitos propios de ellos, y el género *Phlebotomus* cuyas hembras se alimentan sobre vertebrados de sangre caliente. Este género es de sobras conocido por ser los vectores de un parásito, *Leishmania infantum*, que produce la Leishmaniosis canina zoonótica que afecta al perro y en menor medida al gato, a otros mamíferos y también al hombre. Recientemente se está destacando su importante papel también como vector de virus en humanos. Por ejemplo entre ellos la encefalitis producidas por el virus Toscana son mas frecuentes de lo que se sospechaba, detectándose en varias Comunidades Autónomas (Andalucía, Madrid, Castilla La Mancha) (Sanbonmatsu-Gámez *et al.*, 2005).

Aunque menos estudiados los flebotomos también pueden ser buenos vectores de enfermedades de rumiantes. El género *Lutzomyia* de la misma Familia son los vectores de la Estomatitis vesicular en América. El género *Phlebotomus* en laboratorio pueden transmitir de forma mecánica la Fiebre del Valle del Rift. Incluso podría ser los responsables de su mantenimiento en niveles de baja enzootía entre los roedores reservorios porque crían en sus madrigueras y mantienen todo su ciclo en el habitats de estos. Los rumiantes pueden actuar también como reservorios de otros virus que afectan a las personas y que son transmitidos por flebotominos como el virus Chandipura de la India o la Fiebre Papataci en Europa (Rutledge and Gupta, 2009). En Suiza se ha identificado una especie de *Leishmania* que produce lesiones cutáneas en el ganado vacuno (Lobsiger *et al.*, 2010)

En el momento actual las enfermedades de transmisión vectorial están tomando una importancia destacada en la salud animal y humana, siendo importante el disponer de información de todos lo tipos de invertebrados asociados a este tipo de ganadería ya que pueden tener una importancia básica para poder establecer planes de vigilancia entomológica que pueden servir de apoyo a los programas de control de estas enfermedades.

La aparición de la Lengua Azul en España originó la puesta en marcha por parte del actual Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente , de un Plan Nacional de Vigilancia Entomológica de los vectores de la Lengua Azul que, con algunas modificaciones en cuanto

a su intensidad, motivadas por cambios en la presentación de la enfermedad, perdura hasta el momento. Este Plan de vigilancia comprende un muestreo semanal de las poblaciones de *Culicoides* en una serie de explotaciones ganaderas de rumiantes distribuidas por todas las Comunidades Autónomas de nuestro país incluidas las Islas Baleares y las Islas Canarias. El objetivo de este muestreo es capturar insectos del género *Culicoides* vectores de la Lengua Azul, pero las trampas empleadas también han capturado otros dípteros de actividad crepuscular y nocturna como los Culícidos y los Flebotominos.

En este trabajo vamos a exponer los resultados iniciales de las especies de flebotomos encontradas en las muestras procedentes de las capturas realizadas en este Programa.

MATERIAL Y MÉTODOS

La captura de insectos se realizó utilizando trampas mini CDC (Miniatura Blacklight model 1212, John Hock Company, Gainesville, FL, EEUU). Este modelo está dotado de un fuente de luz ultravioleta y es considerada como una herramienta estándar en los programas de monitorización de las poblaciones de *Culicoides* vectores de la Lengua Azul (Mellor *et al.*, 2004). Las trampas, que se ponían en funcionamiento una noche cada semana se suspendían de las estructuras de las granjas a una altura comprendida entre 1,50 y 2 metros sobre el suelo y a una distancia máxima de 5 metros de los animales.

La disposición geográfica de las estaciones de muestreo se intentó ajustar en sus principios a una distribución homogénea, en todo el territorio español, basada en una retícula de cuadrículas de 50x50Km. No obstante diversos condicionantes supusieron algunas desviaciones del muestreo inicial de tal manera que en algunas áreas la intensidad del muestreo fue mayor (Calvete *et al.*, 2009).

El programa de monitorización comenzó en el 2004 y en el presente trabajo presentamos información parcial hasta el año 2012, pues todavía no se han acabado de identificar todos los ejemplares de flebotominos por ser esta una labor muy laboriosa. Todas las capturas una vez retiradas fueron conservadas en alcohol y remitidos al laboratorio de Zaragoza o a algunos de los laboratorios de referencia de las Comunidades Autónomas colaboradoras. En las muestras de todos los insectos se separaron los diferentes grupos de interés veterinario, Ceratopogonidae, Culicidae y Phlebotominae, pues cada uno tiene un procesado diferente. Los Culicoides se identificaban en el acto, mientras que las otros dos grupos de guardaban en etanol de 70% para tratarlos posteriormente.

Los Phlebotominae son insectos de pequeño tamaño que para su correcta identificación tienen que visualizarse sus estructuras genitales y parte del digestivo. Ello exige un largo proceso de aclarado y montaje entre cubre y porta para una adecuada visualización de la genitalia externa e interna en los machos y la faringe y la genitalia interna en las hembras. Para ello se montan entre cubre y porta en Líquido de Hoyer y después de su aclarado y fijación en la estufa a 60 °C durante una semana, se observan al microscopio óptico. Hemos seguido las claves de Theodor (1948) y Croset (1969) para su correcta identificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta el momento se han identificado cinco especies de Phlebotominae de dos Géneros diferentes:

Género *Sergentomyia* : *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* . Género *Phlebotomus*: *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi*, *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti*, *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* y *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus*.

El género *Sergentomyia* está vinculado a la transmisión de enfermedades de reptiles sobre los que se alimenta. Las hembras del género *Phlebotomus* se alimentan de sangre de mamíferos y aves. Suelen ser oportunistas y se alimentan sobre todo de las especies más frecuentes o las más voluminosas. Las cuatro especies de *Phlebotomus* han sido muy abundantes en nuestro país, en especial *Ph. perniciosus* que presenta también una distribución muy amplia detectándose en casi todas las provincias. No se disponen datos de Canarias. La mayoría de los años tiene un periodo de actividad que inicia habitualmente a primeros de mayo aunque pueden comenzar algún año ya en marzo en algunas localidades

mediterráneas, y termina a finales de octubre, pero en ocasiones se han realizado capturas hasta el mes de diciembre.

Los Flebotomos son un grupo de insectos muy frecuente en las explotaciones de rumiantes en España, con especies como *Phlebotomus perniciosus* muy abundantes y con una gran área de dispersión. Presentan un periodo de actividad muy amplio que puede variar de 8 a 10 meses según localidades y años lo que le hace un potencialmente peligroso vector de enfermedades emergentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Calvete, C., et al. 2009. ITEA 105:147-160. •Croset, H. 1969. Thèse Sciencies, Montpellier, 516 pp. •Lobsiger, et al. 2010. Vet Parasitol. 169:408-414. •Mellor, P.S. et al. 1994. Vet Ital. 40:715-717. •Rutledge, L.C., Gupta, R.K. 2009. - In Medical and Veterinary Entomology second Edition. Ed. Mullen GR, Durden LA. Elsevier, Inc. London USA: 153-168p. •Sanbonmatsu-Gámez, et al. 2005. Emer. Infec. Dis. 11:1701-1707. •Theodor, O. 1948. Bull. Entomol. Res. 39: 85-115.

Agradecimientos: Este trabajo ha estado subvencionado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Agradecemos también la colaboración de los servicios veterinarios oficiales de todas las Comunidades Autónomas que han realizado los muestreos y a los propietarios de las explotaciones ganaderas que han colaborado en los mismos.

SANDFLIES (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) ASSOCIATED WITH RUMINANTS FARMS IN SPAIN

ABSTRACT: Insects of the Family Psychodidae and Subfamily Phlebotominae have been identified in samples collected for Entomological Surveillance Program of Bluetongue in Spain. A total of five species have been detected: *Sergentomyia minuta*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi*. *Ph. perniciosus* was the most abundant species with a greater distribution and with a minimum activity period between May and October. We discuss the importance of these insects as potential vectors of emerging diseases in Spain.

Keywords: Sandflies vectors, *Phlebotomus*, ruminants farms, Spain

ETIOLOGÍA DE LOS DECOMISOS EN UN MATADERO DE OVINO

Valcárcel, F., Vilallonga, D., Aguilar, A., Sánchez, M.
Grupo de Parasitología, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), 28130
Valdeolmos, Madrid, España. valcarcel.felix@inia.es

INTRODUCCIÓN

La inspección sanitaria en mataderos es, además de una exigencia legal, una necesidad social para el mantenimiento de un elevado grado de bienestar para el consumidor. Este proceso incluye la revisión de la documentación que acompaña a cada animal, la inspección *ante-mortem* y la inspección *post-mortem* de cada res que se sacrifica. El objetivo es recoger información sanitaria que permita destinar –o no– la carne y productos obtenidos al consumo humano. Los hallazgos durante la actividad de inspección sanitaria son diversos e implican la generación de gran cantidad de decomisos consecuencia de un amplio abanico de patologías en las que por la dinámica de trabajo no se puede profundizar. El objetivo de este trabajo es hacer una aproximación a la etiología de las patologías que afectan al ganado ovino a partir de los decomisos ovinos en matadero.

MATERIAL Y MÉTODOS

La recogida de muestras para este trabajo se realizó entre octubre de 2010 y septiembre de 2011 en un matadero ubicado en la provincia de Madrid. Las explotaciones de procedencia de los ovinos eran de reproducción o cebaderos en el caso de los corderos (pascuales de entre 20 y 25 kg) y únicamente de reproducción en el caso de los ovinos adultos (desviejes, mayores de dos años). Las muestras analizadas en este estudio proceden de decomisos efectuados por el Servicio Veterinario Oficial tras la inspección *post-mortem*. Se seleccionaron partidas y se tomaron muestras en todos los meses, de manera que el experimento nos permitiera estudiar el efecto del tiempo y las estaciones en las variables en estudio a lo largo de un año completo. Cada mes está representado aproximadamente por 40 muestras, 20 de ellas procedentes de corderos y 20 de ovinos mayores. El único mes en el que no se pudieron tomar muestras de ovinos mayores fue diciembre ya que el matadero reserva ese mes para el sacrificio únicamente de corderos al coincidir con el de mayor demanda y consumo asociados a las fiestas navideñas.

Las partidas seleccionadas para recogida de muestras cumplían con la legislación aplicable sobre sanidad animal siendo amparadas todas ellas por un documento de traslado que certificaba su origen y destino, estando los animales convenientemente identificados mediante marcas auriculares que establecían su explotación de procedencia. Una vez que una partida ingresaba en el matadero, se escogía al azar un lote (de 40-50 corderos y de 10-20 en ovinos mayores) y se tomaban muestras de los decomisos producidos en dicho lote.

Los órganos decomisados fueron sometidos a un estudio anatomopatológico macroscópico preliminar en el que se hizo una descripción inicial de las lesiones halladas por las que se realizó el decomiso, ajustándose a los términos utilizados habitualmente por los Veterinarios Oficiales para calificar las lesiones. De cada órgano decomisado se tomaron dos muestras, una se introdujo en una bolsa de plástico y se congeló a -20°C para su posterior procesado laboratorial y la se fijó y conservó en etanol 70%.

Los métodos de análisis laboratorial se realizaron en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), localizado en el municipio de Valdeolmos (Madrid). Las técnicas de diagnóstico empleadas fueron diferentes según la etiología de sospecha, pero se pueden resumir en las siguientes: identificación macroscópica (diagnóstico de presunción), cortes histológicos y tinción con hematoxilina-eosina, tinción de Gram, carbol-fucsina, prueba de catalasa, prueba de la oxidasa, cultivo en agar sangre y/o McConkey, PCR y ELISA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 1945 corderos y 484 ovejas inspeccionadas, se recogieron 577 decomisos (312 y 265, respectivamente). En la tabla 1 se detallan las causas de los decomisos y el/los agente/s etiológicos que pudieron ser identificados. La cisticercosis en corderos y la hidatidosis en ovejas han sido las causas más frecuentes de decomisos de hígado, seguidos en ambos grupos de edad por los abscesos. En los pulmones de cordero, casi todos los decomisos fueron debidos a neumonía enzoótica. Por el contrario, la causa de decomisos

en los pulmones de ovinos mayores fue más variada y aunque la neumonía enzoótica también fue la más frecuente, hidatidosis, linfadenitis caseosa y los abscesos estuvieron presentes en un gran porcentaje de las muestras decomisadas.

Analizando la etiología de origen parasitario, destacan la importancia de la cisticercosis y la hidatidosis en los decomisos de ovejas como ya se ha señalado repetidas veces (Jepson, 1986; Berga y Sánchez, 1990; Sissay *et al.*, 2008; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; entre otros). Este hecho es importante dado que parece indicar que las campañas de control desarrolladas por las distintas administraciones no dan los frutos deseados. Igualmente, es notable la baja presencia de otras parasitosis como la dicrocelosis así como la ausencia de fasciolosis, enfermedades que han sido muy frecuentemente detectadas tradicionalmente. No obstante, hay que tener en cuenta que los animales procedían en su mayoría de zonas donde no se cumplen adecuadamente los requerimientos adecuados para el mantenimiento de su ciclo, al menos para *Fasciola hepatica*.

Entre los decomisos debidos a bacterias, destacan claramente la neumonía enzoótica y los abscesos en jóvenes y adultos, así como la linfadenitis caseosa en adultos. Aunque no existen demasiados datos sobre la importancia de los abscesos como causa de decomiso, coincidimos con otros autores en su alta frecuencia en hígados de cordero (Moreno, 2006; Luzón *et al.*, 2007) y, en nuestro caso, también hemos observado su importancia en pulmones de adultos. Los datos encontrados sobre neumonías corroboran los estudios de Arrigo *et al.* (1984) y Pinto (2011) como elevada causa de decomisos ovinos. Igualmente, en los estudios de Moreno (2006) se apuntó a la linfadenitis caseosa como una importante causa de pérdidas económicas. En definitiva, se han identificado un gran número de agentes, muchos de los cuales no son identificados rutinariamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrigo, J.L., Terzolo, H. R., Casaro, A., Villar, J., 1984. Rev Med Vet 2, 74- 80.
- Berga Monge, A.M. y Sanchez Mendoza, P., 1990. Ovis 9, 67-73.
- Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., 1999. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid.
- Jepson, P.G., Hinton, M.H., 1986. Veterinary Record 118, 584-587.
- Luzón, M., Rojo, F.A., Peñalver, J., López, J., Meana, A., 2007. XII Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza.
- Moreno, B., 2006. Díaz de Santos, Madrid.
- Pinto, C.E., 2011. Tesis Docotoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sissay, M.M., Uggla, A., Waller, P.J., 2007. Trop Anim Health Prod 40, 387-394.

Agradecimientos: Matadero de Villarejo de Salvanés, CISA-INIA. Financiación: Proyecto RTA2010-00094-C03-03

ETIOLOGY OF CONDEMNATIONS IN AN OVINE SLAUGHTERHOUSE

ABSTRACT: A sampling of organs subject to confiscation by the sanitary inspection in an ovine slaughterhouse, both sheep and lambs, in the province of Madrid (Spain) has been conducted over a year. Samples were processed to determine the final diagnosis and the etiology of such diseases. The sheep pathologies found in slaughterhouses are few in number and very dependent on the age of the animal, being very varied in etiology. Diseases that stood out for its high prevalence were found to be parasitic tapeworm processes as cisticercosis and hydatidosis and mixed bacterial infections as enzootic pneumonia in lambs and sheep. Basic pathological, bacteriological and parasitological diagnostic techniques have been found useful in the detection of diseases and are a help to better understand the health status of the national livestock in order to take measures to control the disease and reduce slaughterhouse condemnations. Pathological examination has proved to be sufficient for the diagnosis of parasitic diseases like hydatidosis or cisticercosis but specific parasitological techniques have been required for the detection of trematodes. The basic bacteriological techniques have been useful in the detection of the etiologic agents of several diseases such as enzootic pneumonia, caseous lymphadenitis or liver and lung abscesses.

Keywords: Sheep, bacterial and parasitic agents, slaughterhouse condemnations

Tabla 1. Causas de decomiso detectadas en un matadero de ovino y agentes identificados.

	Corderos		Ovejas		
	n	Agentes identificados	n	Agentes identificados	
Hidatidosis			74	<i>Echinococcus granulosus</i>	
Trematodosis			13	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	
Enfermedad por <i>S. aureus anaerobius</i>			1	<i>Staphylococcus aureus anaerobius</i> <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
Sarcosporidiosis			2	<i>Sarcocystis</i> spp	
Cisticercosis	97	<i>Cisticercus tenuicollis</i>			
Hígado	Abscesos	48	32	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> spp <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Dichelobacter</i> spp. , otros	
				<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> spp <i>Arcanobacterium pyogenes</i> <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Dichelobacter</i> spp. otros	
				2	
				17	<i>S.aureus</i>
				1	<i>Corynebacterium</i>
				1	<i>pseudotuberculosis</i>
				1	otros
				1	otros
				1	
				1	
Hidatidosis			31	<i>Echinococcus granulosus</i>	
Neumonía enzoótica	153	<i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Branhamella catarrhalis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> , <i>Arcanobacterium pyogenes</i> Otros	45	<i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Branhamella catarrhalis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i> , otros	
Pulmón	Linfadenitis caseosa	6	32	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus anaerobius</i> <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	
				32	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
				3	<i>Streptococcus</i> spp.
				2	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Corynebacterium</i>
				2	<i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Arcanobacterium pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> .
				2	Otros
				1	<i>pseudotuberculosis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PÉRDIDAS ECONÓMICAS DEBIDAS A LOS DECOMISOS EN UN MATADERO DE OVINO

Valcárcel, F.; Vilallonga, D., Sánchez, M., Aguilar, A.
Grupo de Parasitología, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), 28130
Valdeolmos, Madrid, España. valcarcel.felix@inia.es

INTRODUCCIÓN

La actividad de inspección sanitaria en los mataderos implica en muchos casos la generación de una gran cantidad de decomisos derivados de reses o sus carnes que han sido declaradas no aptas para el consumo humano por parte del veterinario. Estos decomisos suponen una importante pérdida económica ya sea porque tales carnes no pueden ser destinadas a consumo humano, ya por el “sobrecoste” derivado de su destrucción.

Así, considerando el esencial punto de vista económico, sería muy útil evaluar las pérdidas y costes de tales decomisos para cuantificar el problema. El objetivo de este trabajo es valorar las pérdidas que tienen lugar como consecuencia de los decomisos efectuados en los mataderos de ovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La recogida de muestras para este trabajo se realizó entre octubre de 2010 y septiembre de 2011 en un matadero ubicado en la provincia de Madrid. Las explotaciones de procedencia de los ovinos son de reproducción o cebaderos en el caso de los corderos (pascuales de entre 20 y 25 kg) y únicamente de reproducción en el caso de los ovinos mayores (desviejes, mayores de dos años).

Las muestras analizadas en este estudio proceden de decomisos efectuados por el Veterinario Oficial tras la inspección *post mórtem*. Se escogieron partidas al azar y se tomaron muestras en todos los meses -excepto diciembre-. Cada mes se seleccionaba una partida y se tomaban muestras de los decomisos producidos por un lote de animales de esa misma partida (40-50 corderos y 10-20 ovinos mayores).

La estimación económica de los decomisos de ovinos se calculó a partir de los datos obtenidos durante los muestreos. Para cuantificar las pérdidas económicas por los decomisos se tomaron como referencia los precios a los que el matadero vende la carne y los despojos. Esto se realizó dos veces a lo largo del período de toma de muestras, constatándose que a lo largo del año tales productos mantienen un precio bastante estable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el período de estudio, se sacrificaron en el matadero un total de 50.793 corderos y 28.401 ovinos mayores de dos años de los cuales se analizaron en este estudio 1.945 corderos y 484 ovejas, recogiendo 312 y 265 muestras de decomisos, respectivamente. La mayoría de los decomisos fueron de hígado y pulmón, por lo que en adelante nos referiremos a ambas vísceras.

A la hora de valorar las cifras obtenidas de pérdidas por decomisos en matadero es relevante tener en cuenta los factores que más peso tienen sobre las mismas para ponderar adecuadamente su importancia. Entre éstos, destacan tres: el valor económico del producto decomisado, el número de animales sacrificados y la prevalencia de cada patología. El valor económico de los decomisos se mantuvo bastante estable durante el período de estudio según las fuentes consultadas (estadísticas mensuales de sacrificio del matadero en estudio y estadísticas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). En cuanto al número de animales sacrificados por estación, fue variable tanto en cuanto a la estación como en lo referente a la edad de los animales. Finalmente, en relación con la prevalencia de las diversas patologías no podemos extraer conclusiones definitivas pues no es objeto de este estudio, si bien sí podemos aportar datos reales acerca de los decomisos debidos a las principales enfermedades detectadas.

Para calcular las pérdidas, el coste que supuso cada kilogramo de decomiso de hígado o pulmón fue de 0,87 € tanto de corderos como de ovejas mayores de 2 años. El decomiso de un kg de carne de cordero costó 6,12 € y el de ovino mayor, 2,12 €. En estos costes se incluyen tanto el precio del producto como el coste de su destrucción. En las tablas 1 y 2 se

detallan los costes que supusieron los decomisos en el matadero en los sacrificios de corderos y en ovejas adultas, distribuidas por estación y por víscera decomisada. Como muestran las tablas 1 y 2, el montante de pérdidas por decomisos de órganos ovinos asciende a 18.353 €, lo que es una cifra a considerar seriamente a la hora de hacer un balance económico anual en el matadero en estudio, siendo éste un establecimiento de capacidad de sacrificio media-pequeña. El invierno fue la estación en la que se produjeron mayores pérdidas por decomisos (6.032 €), debidas fundamentalmente a las ovejas. En el otoño las pérdidas fueron más bajas (2.575 €). Los costes en ovinos mayores fueron casi cinco veces superiores que en los corderos a pesar de que el número de sacrificios fue cuatro veces menor. En estas cifras hay que considerar las diferencias en el número de animales sacrificados por edad, estación, el mayor peso de las vísceras de adultos y que los corderos del estudio fueron pascuales y no tuvieron tiempo de contraer muchas enfermedades. Así, el verano parece ser la estación en que porcentualmente las pérdidas fueron mayores: 2,35 € y 46,06 € por decomiso de cordero y de oveja, respectivamente, mientras que en el otoño estas cifras fueron bastante más bajas (1,02 € y 10,09 €). En relación con las vísceras decomisadas, en los corderos predominaron los hígados, mientras que en los adultos no hubo tanta diferencia entre hígado y pulmón. No se decomisó ninguna canal de cordero y en los adultos, aunque fueron muy pocas y sólo en invierno, las pérdidas fueron notables. Cubero *et al.* (1995) también ofrecen cifras muy similares respecto a los hígados de cordero, si bien en su caso y en el nuestro las cifras son menores a los hallazgos de Luzón *et al.* (2007) que indicaron decomisos de hígado en un 25% de los animales. En relación con los pulmones de cordero, Bello *et al.* (2007) señalaron decomisos del 25%, valor muy superior a lo detectado en este caso (datos no mostrados), lo que demuestra la alta variabilidad entre los decomisos de pulmón de diversos ganaderos así como dentro de las distintas partidas del mismo ganadero (Cubero *et al.*, 1995). No hemos encontrado referencias que estimen las pérdidas en ganado ovino adulto en España. No se puede establecer una relación directa entre los datos de nuestro estudio y la situación a nivel nacional, pues hay una enorme cantidad de variables que pueden interactuar. Sin embargo, el número de animales sacrificados en el matadero representa el 0,45% para los corderos y del 4,2% para las ovejas. A partir de estos datos, se podría hacer una estimación de lo que ocurriría con la cabaña ganadera de ovino en España, lo que supondría unas pérdidas anuales que superan el millón de euros (Tabla 3). En definitiva, los decomisos sanitarios llevados a cabo en los mataderos de ovino son una considerable carga económica para la industria alimentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Cubero, G. et al., 1995. Registro de decomiso de vísceras ovinas en matadero. Libro de ponencias de SEOC. ● Luzón, M. et al., 2007. Repercusiones económicas de la cisticercosis hepática ovina. XII Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza. ● Bello, J.M. et al., 2007. Patología observada en corderos de cebadero regulador y su relación con diferentes parámetros ambientales y de manejo. SEOC.

Agradecimientos: Matadero de Villarejo de Salvanés, CISA-INIA. Financiación: Proyecto RTA2010-00094-C03-03

ECONOMIC LOSSES DUE TO CONDEMNATIONS IN AN OVINE SLAUGHTERHOUSE

ABSTRACT: A sampling of organs subject to confiscation by the sanitary inspection in an ovine slaughterhouse, both sheep and lambs, in the province of Madrid (Spain) has been conducted over a year. Economic losses were estimated accordingly official prices in the slaughterhouse (the cost of the product plus its destruction). It concluded that condemnations carried out in slaughterhouses impose a significant economic burden on the food industry. The total o economic losses for sheep condemnations were 19,581€ for the slaughterhouse in studio that means an estimation of over 1 million of euros per year for all ovine slaughterhouses in Spain. For lambs, liver was the main affected organ but in adults the level of affection of liver and lung was similar.

Keywords: sheep, slaughterhouse, economic losses

Tabla 1. Costes, en euros, que supusieron los decomisos de cordero en un matadero de la zona centro peninsular. Entre paréntesis nº de corderos analizados.

	Invierno (550)	Primavera (300)	Verano (350)	Otoño (745)	Año
Hígados	465	489	450	351	1.755
Pulmones	140	48	371	408	968
Canales	0	0	0	0	0
Total	605	537	821	759	2.722
Pérdida por decomiso	1,10	1,79	2,35	1,02	1,40

Tabla 2. Costes, en euros, que supusieron los decomisos de ovinos adultos en un matadero de la zona centro peninsular. Entre paréntesis nº de ovejas analizadas.

	Invierno (120)	Primavera (84)	Verano (100)	Otoño (180)	Año
Hígados	1.507	2.150	2.132	1.033	6.822
Pulmones	604	1.632	2.474	783	5.493
Canales	3.316	0	0	0	3.316
Total	5.427	3.782	4.606	1.816	15.631
Pérdida por decomiso	45,22	45,02	46,06	10,09	32,29

Tabla 3. Estimación de los costes, en euros, que supondrían los decomisos de ovinos en España.

	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Año
Corderos	144.066	261.626	201.084	129.131	735.907
Ovejas	142.610	104.440	115.368	29.931	392.349
Total	286.676	366.067	316.452	159.062	1.128.256

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LESIONES MANDIBULARES OVINAS EN CAMPO Y MATADERO

Ruiz de Arcaute, M.^{1,2}, Ferrer, L.M.¹, Lacasta, D.¹, Bueso, J.P.³, Borobia, M.^{1,4}, De las Heras, M.¹, Ortega, M.², González, J.M.², Gartzandía, A., Ortín, A.¹, Marca, C.¹, Loste, A.¹, Ramos, J.J.¹

¹Facultad de Veterinaria, ²Gabinete Técnico Veterinario S.L., Laboratorio Agroambiental de Zaragoza³, Exopol⁴.

Facultad de Veterinaria de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza
martarda@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de los recursos alimenticios precisa de animales sanos en su conjunto, y de forma particular la boca y sus anejos, mandíbulas, dientes, etc., deben encontrarse en buen estado, de manera que puedan cortar el pasto masticarlo e ingerirlo. La presencia de lesiones mandibulares en el ganado ovino va a tener una repercusión económica negativa sobre las explotaciones, que se refleja en una disminución de las producciones, lo que supone un acortamiento de la vida útil o productiva de los animales.

La osteomielitis es el proceso inflamatorio que tiene su origen en las áreas vasculares de la cavidad medular de los huesos (Thompson, 2007). La osteomielitis mandibular es un proceso poco estudiado en el ovino y, en la mayoría de las ocasiones, se suelen extrapolar los conocimientos adquiridos en vacuno a esta especie. Según Radostits *et al.* (2002) en el ganado vacuno se ha detectado que la incidencia es más elevada cuando los animales se alimentan con granos, ensilado y paja o pastos groseros, debido a que estos alimentos tienen más capacidad para dañar y penetrar en la mucosa oral, permitiendo por tanto la subsiguiente entrada y colonización de microorganismos patógenos.

En el ganado ovino, la osteomielitis se asocia a la movilidad o pérdida de algún molar. Afecta en mayor proporción a ovejas de mayor edad en las que suele faltar algún molar o éste puede estar desplazado (Figura 1). Esto permite suponer que en el ganado ovino la alimentación grosera pueda ser un factor a destacar ya que se introduce entre los molares y el hueso mandibular haciendo de cuña y facilitando el acceso directo de bacterias oportunistas al interior de la mandíbula (Figura 2) (Thompson, 2007).

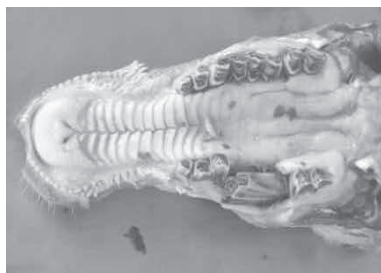


Figura 1: Desplazamiento de molares.



Figura 2: Restos vegetales en cavidad alveolar

Las alteraciones de los dientes molares y premolares han recibido escasa atención debido a lo difícil de su inspección clínica. Sin embargo, estudios de matadero han demostrado que las alteraciones dentarias de las piezas mandibulares son frecuentes en las ovejas y pueden convertirse en un grave problema para la producción del rebaño. (Aitchison, y Spence, 1984).

Normalmente, estas alteraciones se hacen visibles solamente cuando el animal pierde demasiado peso corporal o cuando deja de comer por la imposibilidad de masticar el alimento. En fases avanzadas también es posible apreciar inflamación en la zona de la mandíbula y, ocasionalmente, halitosis.

Para el diagnóstico de esta patología es necesario realizar la palpación externa de los huesos mandibular, maxilar y de los nódulos linfáticos regionales. En ese caso se pueden observar unos abultamientos duros y óseos en la región de los molares y la posible presencia de fístulas en la cara ventral o lateral de la mandíbula.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó a dos niveles, por un lado se llevó a cabo un trabajo en matadero para ver el porcentaje de animales que llegaban a él con lesión mandibular y de qué tipo se trataba y por otro lado en explotaciones comerciales de ovino se pretendió determinar la prevalencia de la enfermedad, los factores que influyen en la aparición de la misma y realizar un perfil de la lesión.

En la investigación llevada a cabo en matadero, del total de 1.015 animales, se encontraron 158 con lesión mandibular y se tomó al menos una muestra de cada mandíbula afectada. Los datos obtenidos de las lesiones se recogieron en una ficha clínica al igual que los resultados microbiológicos y fueron incorporados a una base de datos. Las ovejas analizadas en matadero tenían orígenes diversos y, en su mayor parte, desconocidos; el único hecho común a todos ellos es que son animales procedentes de los desviejes llevados a cabo en las explotaciones y la mayoría de ellas son de edad avanzada.

En cuanto al trabajo de campo, se estudiaron un total de 2.166 animales pertenecientes a cinco explotaciones situadas en la Comunidad Autónoma de Aragón y en la Comunidad Valenciana encontrando un total de 124 afectados. En dichas explotaciones se marcaron las ovejas que presentaban lesiones mandibulares para realizar una inspección clínica pormenorizada de cada una de ellas. En estos exámenes, se palpaban el maxilar superior e inferior y los linfonódulos regionales: submandibular, retrofaringeo y parotídeo, principalmente. La información fue recogida en unas fichas clínicas individuales. Para el análisis de los factores que pudieran favorecer el desarrollo de estas lesiones se realizó una encuesta epidemiológica al ganadero, en la que se recogían datos de alimentación, agua de bebida, edad de los animales, el tipo de tierra, si es zona de secano o regadío y el manejo sanitario de la explotación.

En las explotaciones analizadas se realizó un seguimiento de los animales de desvieje destinados a matadero con el fin de detectar aquellos que presentaban lesión mandibular y poder realizar un estudio más detallado de los mismos. Estas cabezas fueron llevadas a la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza para su estudio anatomopatológico.

A partir de los datos recogidos con las encuestas se desarrolló una base de datos en formato Excel, plantilla sobre la que se ha realizado el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia de lesiones mandibulares a nivel de explotación presenta niveles medios, alrededor del 5%, mientras que en animales de desvieje en matadero, los niveles alcanzan un 15%. Este nivel de prevalencia a nivel de explotación (5,72%) es similar al obtenido por Hoefs *et al.* (2001) en un estudio realizado sobre ovejas domésticas europeas, en las que encontraron que tenían una prevalencia del 5%. Cuando el estudio lo realizaron sobre las ovejas salvajes de Canadá y Norteamérica, aumentaba la prevalencia hasta un 23,3% y 29,3%.

La edad de los animales es un factor de riesgo en la presentación de lesiones mandibulares, a partir de los tres años el riesgo de presentar lesiones se multiplica. El factor explotación influye en la prevalencia de lesiones mandibulares, especialmente a partir de los tres años.

En cuanto al perfil de las lesiones mandibulares, coinciden los dos estudios, matadero y granja, en que no hubo apenas diferencia según la afectación del cuerpo mandibular izquierdo o derecho; en cuanto a la localización, cerca del 80% de las ovejas tuvieron la lesión en la porción distal del cuerpo mandibular; la mayor parte tenían la lesión cerrada (93%); en más de la mitad de los animales era difusa (57,30%) sin estar localizada en un punto en concreto; un 57% del conjunto con ausencia de alguna pieza dentaria; con respecto al grado de alteración de la cara fue leve en un 53,50% de los animales y el 78,60% tenían los linfonódulos regionales alterados.

Más del 50% de las ovejas de desvieje estudiadas en matadero presentaron pérdida de algún premolar o molar, siendo frecuente la pérdida de más de una pieza dentaria. El primer premolar fue la pieza que faltó con más frecuencia y mayoritariamente como pérdida única.

En las lesiones mandibulares se determinó la presencia de más de 40 gérmenes diferentes. Sin embargo no se aisló *Actinomyces* spp. En la mayor parte de los casos los cultivos fueron de tipo mixto. Como cultivos puros se aislaron con mayor frecuencia gérmenes de género *Streptococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *E. coli*, *A. pyogenes* y *Klebsiella* spp y los gérmenes

más frecuentemente aislados fueron *Streptococcus* spp, presente en casi en la mitad de las muestras, *Bacillus* spp y *Arcanobacterium pyogenes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitchison, G.U., Spence, J.A. 1984. Dental disease in hill sheep: An abattoir survey. J. Comp. Pathol. 94:285–300.
- Hoefs, M., Bunch, T.D. 2001. Lumpy jaw in wild sheep and its evolutionary implications. J. Wild. Dis. 37:39-48.
- Radostiis, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C; Hinchcliff, K.W. 2002. Medicina Veterinaria. 9ª ed. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid. pp 1105-1117.
- Thompson, K. 2007. Bones and Joints. Inflammatory diseases of bones. In Jubb, Kennedy, and Palmer´s Pathology of Domestic Animals. Vol 1: 92-105.

EPIDEMIOLOGIC STUDY OF OVINE MANDIBULAR LESIONS IN FIELD CONDITIONS AND SLAUGHTERHOUSE

ABSTRACT: This work describes the prevalence of ovine mandibular lesions and its profile in field conditions and slaughterhouse. The prevalence of mandibular lesions in commercially exploited sheep is about 5%, whereas rates reach 15% in those old animals which go to slaughterhouse. Both studies, for slaughtered and farm animals, show that the profile of mandibular lesions is very similar according to the mandibular body involvement. As regards the location, this lesion was found in the distal part of mandibular bodies in almost 80% of the sheep, 93% of the animals had the lesion closed and in the 57.30% of the sheep the lesion covered a wider area. A lack of any of the dental pieces was found in 57% of the whole group studied. According to the degree of the face alteration, a minor alteration was found in the 53.50% of the animals, and 78,60% showed an alteration in the regional lymph nodes. Microbiological studies revealed more than forty different germs implicated in the lesions studied, but *Actinomyces* spp was not found in any of them. Most of the germs resulted mixed cultures and the more frequently isolated germs in pure cultures were *Streptococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *E. coli*, *Arcanobacterium pyogenes* and *Klebsiella* spp.

Keywords: Ovine, mandibular lesions.

USO DE LOS RAYOS X EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS PATOLOGÍAS DE VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS EN EL GANADO OVINO.

Ruiz de Arcaute, M.^{1,2}, Ferrer, L.M.¹, Lacasta, D.¹, Conde, T.^{1,4}, Fondevila, J.^{1,3}, Gartzandia, A.¹, González, J.M.², Ortega, M.², Ortín, A.¹, Marca, C.¹, Espada, M.^{1,2} y Figueras, L.^{1,2}.

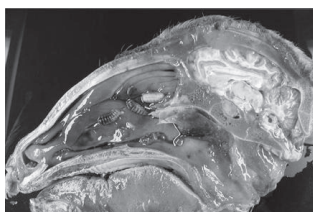
¹Facultad de Veterinaria, ²Gabinete Técnico Veterinario S.L., ³Veterinario clínico équidos, ⁴Vetequinar (Zaragoza).

Facultad de Veterinaria. C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza martarda@unizar.es

INTRODUCCIÓN

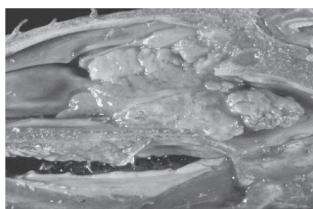
Las patologías del tracto respiratorio superior son específicas y bastante comunes en el ganado ovino. Las enfermedades más importantes que afectan al tracto respiratorio superior en España son: *oestrosis*, *adenocarcinoma nasal*, *rinitis crónica proliferativa* causada por *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* y *estertor nasal crónico ovino (ENCO)*. Con menor frecuencia, encontramos: abscesos en cornetes nasales, espiguillas, parasitación por sanguijuelas, etc. Este trabajo propone un método para mejorar el diagnóstico diferencial *in vivo* de estas enfermedades mediante el uso de la radiografía.

La *oestrosis* es una miasis cavitaria producida por los estados larvarios del díptero *Oestrus ovis*, los cuales se localizan preferentemente en las regiones nasales, sinusales y faríngeas del ganado ovino. Es un parásito obligado de los pequeños rumiantes, provocando en ellos una afección de curso crónico, de carácter estacional, que se caracteriza clínicamente por catarro nasal y sinusal acompañado de flujo de consistencia variable, estornudos, lagrimeo, dificultad respiratoria y movimientos anormales de la cabeza, todo esto dependiendo de la evolución de las distintas fases larvarias (Figuras 1 y 2).



Figuras 1 y 2: Larvas de *Oestrus ovis* en una infestación nasal en oveja.

El *adenocarcinoma nasal enzoótico* es una enfermedad tumoral de los pequeños rumiantes que se caracteriza por una transformación neoplásica de las células epiteliales secretoras de



Figuras 3 y 4: Área etmoidal afectada por el Adenocarcinoma nasal en una oveja.

la mucosa nasal y que afecta de forma natural al ganado ovino. Producida por un retrovirus oncogénico, causa en los animales un flujo nasal seromucoso unido a una respiración estertórea, tos y también disnea. El flujo continuado de secreción nasal ocasiona una decoloración característica y una pérdida de pelo alrededor de los ollares. Consecuencia de la masa tumoral puede producirse la deformación del cráneo, con alteraciones de la zona periorcular que provoca el exoftalmos característico de los casos graves (Figuras 3 y 4).

La *rinitis crónica proliferativa* causada por *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae* serotipo 61: K: 1, 5, (7) es un proceso inflamatorio crónico que afecta a los cornetes

ventrales de las fosas nasales del ganado ovino. La sintomatología clínica de los animales afectados es muy característica con un sonido nasal ronco y seco. Revela secreción nasal escasa y cuando aparece es de tipo mucoso. Los síntomas van en aumento de forma progresiva hasta provocar una obstrucción completa de fosas nasales (Figuras 5 y 6).



Figuras 5 y 6: Rinitis crónica proliferativa afectando al cornete ventral.

El *estertor nasal crónico ovino (ENCO)* es un síndrome de etiología desconocida. Se caracteriza por el sonido respiratorio aumentado causado por obstrucción intranasal consecuencia de una hipertrofia inflamatoria de la mucosa en las proximidades de los ollares.

Otro proceso a incluir en el diagnóstico diferencial son las deformaciones traqueales en el ganado ovino. Son más frecuentes de lo que se podía esperar, normalmente los traumatismos sobre la tráquea son causados por el uso de comederos inadecuados o por la competencia por el alimento, aunque no hay trabajos que comprueben estas hipótesis. Sintomatológicamente escuchamos silbidos inspiratorios por estrechamiento de tráquea o en caso de colapso traqueal.

MATERIAL Y MÉTODOS

La radiología diagnóstica es la subespecialidad de la radiología que estudia la estructura anatómica y la fisiología de los tejidos normales y de los tejidos alterados por distintas enfermedades a través de imágenes estáticas o dinámicas. Las imágenes se han obtenido exponiendo la región corporal a analizar a un haz de rayos X, éstos inciden luego sobre una película sensible, y producen una imagen estática. La imagen obtenida se denomina radiografía. La radiografía digital está siendo incorporada gradualmente por los veterinarios en los procedimientos clínicos normales. Las imágenes radiográficas digitales tienen alta calidad y se pueden guardar como ficheros informáticos y las pueden ver en una pantalla de ordenador, transmitidos electrónicamente o impresos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los procesos de las vías respiratorias superiores los signos clínicos son muy similares: secreción nasal unilateral o bilateral, disnea inspiratoria, estornudo, ronquidos, etc. Para poner en práctica las medidas preventivas o curativas necesarias, es importante ser capaz de diferenciar entre estos procesos en las etapas tempranas de las enfermedades. Para ello técnicas complementarias de diagnóstico como una radiografía pueden llegar a ser realmente útiles en el trabajo diario del veterinario clínico para ayudar a precisar este tipo de patologías.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lacasta, D.; Ferrer, L.M.; Ramos, J.J.; Bueso, J.P.; Borobia, M.; Ruiz de Arcaute, M.; Figueras, L.; González-Sainz, J.M.; De las Heras, M. (2012) Chronic proliferative rhinitis associated with *Salmonella enterica subsp. diarizonae* 61:k:1:5:(7) in sheep in Spain. J Com Path 2012 Vol 147, 406-409.
- De las Heras M, Ortín A, Cousens C, Minguijón E, Sharp JM. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. Curr Top Microbiol Immunol. 2003;275:201-23.
- Rugg. D.; Ferrer, L.M.; Sarasola, P.; Figueras, L.; Lacasta,D; Liu, B.; Bartram, D. (2012) Persistent efficacy of a long acting injectable formulation of moxidectin against natural infestation of the sheep nasal bot (*Oestrus ovis*) in Spain. Vet. Paras. 2012 Vol. 188, 330-336.
- García Sanmartín, J.; García Pérez A.L.; Barandika, J.; Ariznabarreta, A.; Juste, R.A.; Moreno, B.; Gómez, N.; Aduriz, G.; Berriartua, E. (2002) Estertor nasal crónico ovino (ENCO). Descripción clínica y epidemiológica y su relación con el Eczema facial. SEOC 2002.

USE OF PORTABLE X-RAY IN THE DIAGNOSIS OF THE OVINE UPPER RESPIRATORY TRACT PATHOLOGIES.

ABSTRACT: In this paper we present an initial collection of X-ray images of the most relevant pathological processes affecting the upper respiratory tract of the sheep. Its diffusion to both veterinary students and practitioners will provide them with a resource of potential value and it will become in a useful tool in some research as well.

Keywords: Sheep, Portable X-Ray.

UTILIZACIÓN DE LA TERMOGRAFÍA DE INFRARROJOS DURANTE EL ORDEÑO PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIONES INTRAMAMARIAS EN OVEJAS

Castro-Costa, A.¹, Caja, G.¹, Salama, A.A.K.¹, Rovai, M.¹, Flores, C.¹ y Aguiló J.²
¹Grup de Recerca en Remugants (G2R), Ciència Animal i dels Aliments; ² Grup de Aplicacions Biomèdiques (GAB), Microelectrònica i Sistemes Electrònics; Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona). gerardo.caja@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico precoz de las infecciones intramamarias (IMI) es un aspecto de interés en ovejas lecheras, debido a sus efectos en la producción y al coste de sus tratamientos (Bergonier et al., 2003; Gonzalo et al., 2006). Los animales responden a las IMI a nivel local (inflamación de la ubre, endurecimiento,...) y sistémico (producción de anticuerpos, fiebre, dolor...), siendo la respuesta variable según el agente infeccioso (Pyörälä, 2003).

La termografía de infrarrojos (IRT) es una técnica que permite medir, a distancia y sin contacto, la temperatura de una superficie. Mediante IRT se pueden generar imágenes de la cantidad de calor emitida por un objeto, que han sido utilizadas para detectar cambios en la temperatura de la ubre en vacas, según su estado sanitario (Barth, 2000; Scott et al., 2000; Hovinen et al., 2008), y en ovejas lecheras, según los parámetros de ordeño (Murgia et al., 2008). No existe información sobre la utilidad de la IRT para el diagnóstico de IMI en ovejas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de la IRT para detectar infecciones mamarias en condiciones prácticas, así como en el caso de una infección aguda simulada mediante la infusión de endotoxina de *E. coli*, en ovejas lecheras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 83 ovejas lecheras (Manchega, n = 48; Lacaune, n = 35) del rebaño experimental del SGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) de la UAB (Bellaterra, Barcelona) en dos experimentos realizados al inicio (Exp. 1) y final de lactación (Exp. 2).

Exp. 1: Las ovejas se ordeñaron a máquina 2 veces al día (0800 y 1700 h) a partir del destete de los corderos (35 d) y se tomaron imágenes IRT de las ubres de las ovejas, antes y después de cada ordeño diario (a.m y p.m), a los 46 y 56 d de lactación (producción de leche $1,57 \pm 0,05$ L/d). Las IRT se realizaron con una cámara portátil de infrarrojos (IRI 4010, Irisys, Northampton, UK), en un total de 10 sesiones, con las ovejas inmovilizadas en el cornadizo de la sala de ordeño, desde una vista caudal y a 0,5 m de la ubre. La temperatura superficial de la ubre (UST) se obtuvo a partir de las imágenes IRT, utilizando el software propio de la cámara (Series Imager v.1.0.0.17). La detección de IMI se realizó mediante cultivo bacteriano de muestras de leche a los 15, 34 y 64 d de lactación.

Exp. 2: Se utilizó una muestra de 9 ovejas, con ubres simétricas y sanas (confirmadas por cultivo bacteriano), al final de la lactación (155 ± 26 d) y ordeñadas 1 vez al día (08:00 h; producción de leche $0,58 \pm 0,03$ L/d), en las que se simuló una IMI para producir una respuesta inflamatoria aguda. Para ello se aplicó un desafío "IMI-challenge" (Hovinen et al., 2008) consistente en una infusión intramamaria de 1 mL de lipopolisacárido (5 µg/mL en solución salina fisiológica aséptica) de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) aplicada 30 min después del ordeño de la mañana (h 0). Las ovejas se dividieron en 3 grupos equilibrados de 3 ovejas a las que se aplicaron los tratamientos experimentales por media ubre. Los tratamientos consistieron en: 1) control (C00, sin tratar), 2) mitad de la ubre tratada (T10 y C01, media ubre tratada y la otra sin tratar, respectivamente) y 3) ambas mitades de la ubre tratadas (T11, tratadas). La respuesta inflamatoria al challenge se valoró mediante el seguimiento de: producción, composición, recuento de células somáticas (RCS) y test de California (CMT) de la leche ordeñada durante 3 d, así como de muestras adicionales tomadas manualmente (6, 24, 48 y 72 h), la temperatura vaginal (cada 2 h, de 2 a 12 h; cada 12 h, de 12 a 24 h; cada 24 h, de 24 a 72 h) y la de la ubre (UST: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 25, 28, 32, 36, 48, 49, 72 y 73 h). La UST media se obtuvo como en el Exp. 1, por duplicado en cada media ubre.

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA usando el PROC MIXED de SAS (v. 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC, EEUU). La relación entre las variables estudiadas se determinó por medio de correlaciones de Pearson. Las diferencias entre medias se declararon a $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Exp. 1, se detectaron 22 ovejas con IMI subclínicas en al menos media ubre, siendo las 61 restantes sanas (14,5% y 85,5% medias ubres IMI y sanas, respectivamente). Un total de 3 ovejas mostraron mastitis clínica (2,4% medias ubres) y sus IRT fueron estudiadas separadamente. Tal como se indica en la Tabla 1, las únicas diferencias detectadas en la UST media lo fueron por efecto de la raza (Lacaune, $+0,35 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$, $P < 0,01$) y del ordeño (después del ordeño, $+0,13 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$; $P = 0,05$; p.m., $+0,79 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$; $P < 0,001$). No se detectaron diferencias por efecto del estado sanitario, ni por el lado de la ubre ($P > 0,05$). Las diferencias tampoco fueron significativas en el caso de las mamicis clínicas. La falta de respuesta no pudo atribuirse a una escasa sensibilidad de la cámara, que resultó adecuada, tal como indican los ESM observados (0.05 a 0.16°C). Las diferencias en UST se atribuyeron a las características de la piel de las ovejas (mas fina y rosada en la Lacaune), a la irritación producida por el ordeño, de acuerdo con Murgia et al. (2003), y al aumento de la temperatura ambiente que se correlacionó linealmente con la UST ($r = 0,88$; $P < 0,001$).

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza de las temperaturas de la superficie de la ubre (UST, $^{\circ}\text{C}$) en ovejas lecheras.

Variables consideradas	Variable 1	Variable 2	$\pm\text{ESM}$	$P =$
Raza (1 = Manchega, 2 = Lacaune)	32,88	33,23	0,11	0,003
Lado de la ubre (1 = izquierda, 2 = derecha)	33,05	33,06	0,11	0,879
Turno de ordeño (1 = a.m., 2 = p.m.)	32,66	33,45	0,06	0,001
Momento del ordeño (1 = antes, 2 = después)	32,99	33,12	0,05	0,014
Estado sanitario de la ubre (1 = sana, 2 = IMI)	33,11	33,00	0,16	0,484

En el Exp. 2, la baja dosis de endotoxina utilizada ($0,083 \mu\text{g}/\text{kg BW}$) fue suficiente para producir síntomas de IMI en la leche (aparición de copos desde 2 h, aumento de RCS y CMT desde las 6 h) y reducir fuertemente la producción. En comparación, las dosis usadas por Hovinen et al. (2008) y Willard et al. (2007) en vacas lecheras fueron de 0,02 a $2,60 \mu\text{g}/\text{kg BW}$, respectivamente. La caída de producción de las tratadas (T11 y T10) vs. no tratadas (C01 y C00) fue $-33,1$ ($P < 0,05$), $-41,4$ ($P < 0,001$) y $-36,6\%$ ($P < 0,001$) a las 24, 48 y 72 h post-desafío, respectivamente. La temperatura vaginal sólo aumentó a las 6 h post-desafío en T10 ($P < 0,05$) pero no en el resto. No se detectaron diferencias entre tratamientos para UST ($P = 0,752$), con la excepción de T11 que mostró un máximo a las 6 h post-desafío ($P < 0,001$), tal como se observa en la Figura 1. Los efectos del desafío en UST, CMT y temperatura vaginal fueron desapareciendo a partir de la h 12, aunque se mantuvieron hasta las hasta 72 h en el contenido en lactosa y RCS de la leche (Tabla 2). La temperatura ambiente también se correlacionó linealmente con la UST ($r = 0,60$; $P < 0,001$). En conclusión, pese a la sensibilidad observada para detectar cambios en la temperatura de la ubre entre razas y momentos de ordeño, la IRT no resultó de utilidad para detectar la aparición de IMI clínicas o subclínicas en ovejas. Estos resultados contradicen lo indicado previamente en vacas lecheras (Scott et al., 2000; Willard et al., 2007; Hovinen et al., 2008).

Tabla 2. Efecto de la infusión de endotoxina de *E. coli* 55:B5 en la composición de leche por media ubre y tratamiento en ovejas lecheras.

Item	Tiempo, h ¹	Control ²		Tratado ²		$\pm\text{ESM}$	Efecto ($P =$)
		C00	C01	T10	T11		
Lactosa, %	6	4,46 ^c	4,51 ^c	2,73 ^a	3,47 ^b	0,12	0,001
	24	4,29 ^c	4,48 ^c	2,02 ^a	2,92 ^b	0,10	0,003
	48	4,13 ^c	4,42 ^c	2,90 ^a	3,11 ^a	0,13	0,003
	72	4,12 ^{ab}	4,23 ^{bc}	3,59 ^a	3,73 ^{ac}	0,13	0,002
Log ₁₀ RCS	6	5,66 ^a	5,88 ^a	7,22 ^b	7,27 ^b	0,06	0,001
	24	5,46 ^a	5,91 ^a	6,24 ^a	7,32 ^b	0,17	0,005
	48	5,32 ^a	5,49 ^a	7,28 ^b	7,13 ^b	0,05	0,001
	72	5,24 ^a	5,27 ^a	6,37 ^b	6,69 ^b	0,07	0,001

^{a-c}Letras distintas en la misma fila indican diferencias a $P < 0,05$. ¹Tiempo post-desafío. ²Tratamientos por media ubre: C00 (ambas ubres sin tratar), T10 y C01 (media ubre tratada y la otra mitad sin tratar, respectivamente), y T11 (ambas mitades de la ubre tratadas).

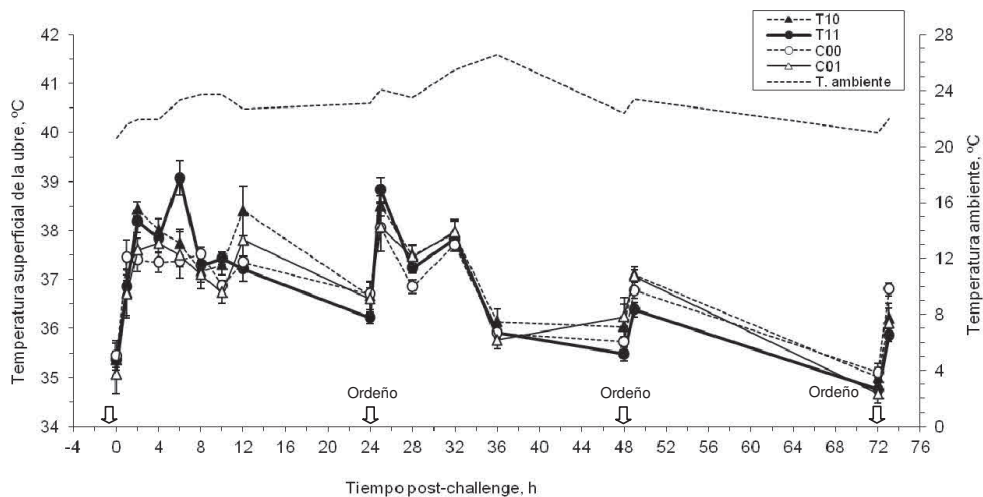


Figura 1. Variación de la temperatura superficial de la ubre de ovejas lecheras sometidas a un desafío de endotoxina de *E. coli* O55:B5.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Barth, K. 2000. Basic investigations to evaluate a highly sensitive infrared-thermograph technique to detect udder inflammation in cows. *Milk Sci. Int.* 55:607–609. • Bergonier, D., De Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G. & Berthelot, X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34:689–716. • Gonzalo, C., Carriedo, J. A., Beneitez, E., Juárez, M. T., De La Fuente, L. F. & San Primitivo, F. 2006. Bulk tank total bacterial count in dairy sheep: factors of variation and relationship with somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 89:549–552. • Hovinen, M., Siivonen, J., Taponen, S., Hanninen, L., Pastell, M., Aisla, A. M. & Pyörälä, S. 2008. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *J. Dairy Sci.* 91:4592–4598. • Murgia, L., Stelletta, C., Caria, M., Giancesella, M., Gatto, M., Pazzona, A. & Morgante, M. 2008. Using infrared thermography to monitor the effect of different milking vacuum levels on teat tissue in dairy ewes. *Internat. Conf. Agric. Eng.*, Hersonissos, Greece, 23-25 June. P-131. • Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34:565–578. • Scott, S. L., Schaefer, A. L., Tong, A. K. W. & Lacasse, P. 2000. Use of infrared thermography for early detection of mastitis in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 80:764(Abstr.).

USING INFRARED THERMOGRAPHY DURING MILKING FOR DETECTING INTRAMAMMARY INFECTIONS IN DAIRY EWES

ABSTRACT: A total of 83 Manchega and Lacaune dairy ewes were used in 2 experiments for assessing the ability of infrared thermography (IRT) to detect intramammary infections (IMI) by mean of udder skin temperatures (UST). In Exp. 1, IRT pictures were taken immediately before and after milking at 46 and 56 d of lactation. No UST differences were detected by effect of IMI (healthy vs. IMI; $P = 0.484$). However, differences in UST were detected by breed ($P = 0.003$) and milking moment ($P = 0.014$) and turn ($P < 0.001$). In Exp. 2, 9 healthy ewes were used for studying the UST response to an *E. coli* O55:B5 endotoxin challenge during 3 d. Treatments were applied by udder half after milking. For all treatments, UST increased post-challenge, peaking at h 2 and decreasing thereafter without differences between treatments until h 4 ($P = 0.556$), but peaked at h 6 when both udder halves were treated ($P < 0.001$). Positive correlations between UST and ambient temperatures were detected ($r = 0.60$ to 0.88). In conclusion, despite the high sensitivity of the camera, the IRT was unable to discriminate between UST changes of the healthy and the IMI udders in dairy ewes.

Keywords: infrared thermography, mastitis, sheep, endotoxin.

RELACION ENTRE LA EXCRECIÓN DE *COXIELLA BURNETII* EN HECES, LECHE Y FLUIDO VAGINAL AL PARTO y LA PRESENCIA DE LA BACTERIA EN LOS COTILEDONES PLACENTARIOS

Tutusaus –Batlle¹, J., López-Gatius, F. y Garcia-Ispierto, I.

¹Departamento de Producción Animal, ETSEA, Universidad de Lleida. Av. Rovira Roure nº 191. 25198 Lleida. joantutusaus@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La fiebre Q es una zoonosis endémica a nivel mundial producida por un bacilo Gram negativo intracelular obligado, *Coxiella burnetii* (Maurin y Raoult, 1999). A pesar de que existe un amplio rango de hospedadores, los rumiantes domésticos constituyen los principales reservorios y la fuente de infección más importante para los humanos (Maurin y Raoult, 1999). La sintomatología clínica ha sido extensamente estudiada en humanos y en pequeños rumiantes, pero existe controversia en la vaca. Frecuentemente se asocia con problemas subclínicos, de los cuales destacan la subfertilidad, placentitis, metritis, mastitis (Porter *et al.*, 2011) o problemas endocrinos, siendo los abortos esporádicos en esta especie (To *et al.*, 1998; Garcia-Ispierto *et al.*, 2010). Además, la bacteria se excreta al medio ambiente a través de uno o varios canales, como son el fluido vaginal, los productos del parto y los abortos, la placenta, las heces y la leche y pueden existir animales seropositivos no excretores, y excretores seronegativos. Por todo esto la detección de animales infectados es complicada a nivel de granja (Guatteo *et al.*, 2007). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la posible relación entre la presencia de *Coxiella burnetii* en los cotiledones placentarios el día del parto con la retención de placenta, los terneros nacidos muertos, la serología y la excreción bacteriana por otras vías como son el fluido vaginal, la leche y las heces durante los días 171-177 de gestación y el día del parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos explotaciones comerciales de vacuno lechero Frisón de alta producción en el noreste de España con 625 y 125 vacas en lactación de octubre de 2010 a octubre de 2011, en rebaños infectados por Fiebre Q. Un análisis previo al estudio mediante PCR cuantitativa de leche de tanque reveló la existencia de una infección natural en los dos rebaños por *Coxiella burnetii*. Los datos de este estudio se obtuvieron de 78 vacas lecheras de alta producción procedentes de las dos explotaciones.

Diseño experimental

Las vacas se muestrearon los días 171-177 de gestación y el día del parto. En los dos muestreos se extrajo sangre para la determinación de los niveles plasmáticos de anticuerpos específicos frente a *Coxiella burnetii* y se tomaron muestras de heces, fluido vaginal, leche y calostro y cotiledones el día del parto, para detectar *C. burnetii* mediante PCR cuantitativa (QIAmp DNA minikit®, Qiagen S.A. and LSI Taqvet *Coxiella burnetii*®; Laboratoire Service International, Francia). Para la detección de anticuerpos anti *C. burnetii* se utilizó un kit de ELISA indirecto (LSIVET RUMINANT, Laboratoire Service International, Francia).

Datos registrados y análisis

Se realizaron seis regresiones logísticas binarias mediante el programa estadístico SPSS (versión 18). Para las regresiones se utilizaron la retención de placenta, los nacidos muertos, la serología en los días 171-177 de gestación, la excreción en el parto, la excreción al parto, y la presencia de *C. burnetii* en los cotiledones como variables dependientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La población de estudio estaba comprendida por 15 primíparas y 63 múltiparas. En los días 171-177 días de gestación se diagnosticaron 41 vacas seropositivas (52,6%) frente a *C. burnetii*. Se analizaron un total de 546 muestras mediante PCR, de las cuales el 8,6% resultaron positivas (n=47) (Tabla 1). En concordancia con otros estudios (Harris *et al.*, 2000), las muestras analizadas indican un aumento de excreción vía vaginal durante el parto, comparado con otros periodos.

Mediante regresión logística no se encontraron relaciones significativas entre la retención de placenta, los terneros nacidos muertos, la seropositividad y la excreción de *C. burnetii* en los días 171-177 de gestación con la presencia de *C. burnetii* en los cotiledones placentarios. Estos hallazgos refuerzan la idea de que en ganado vacuno las infecciones por *C. burnetii* se caracterizan por su forma subclínica (Guatteo *et al.*, 2007). En un estudio reciente (Tutusaus *et al.*, 2013, aceptado para publicación) se ha observado que todos los terneros nacen seronegativos, con independencia del perfil serológico y el patrón de excreción maternos. Análisis histológicos son necesarios para determinar las consecuencias de la presencia de la bacteria en la placenta, así como determinar el momento concreto de infección placentaria y/o fetal.

En el presente trabajo la totalidad de las vacas incluidas en el estudio (n=78) tuvieron un parto a término, independientemente de la presencia o no de la bacteria en los cotiledones (17%). Este hecho refuerza la idea de que *C. burnetii* raramente produce abortos en la especie bovina a pesar de que las células trofoblásticas sean una localización habitual de la bacteria (Ben-Amara *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2011). Sin embargo la cepa y el estado inmunológico son factores que se deberían tener en cuenta debido a que podrían condicionar la aparición de la sintomatología clínica.

Según la Odds ratio, la probabilidad de presentar cotiledones PCR positivos a *C. burnetii* al parto es 10,3 veces mayor en las vacas excretoras al parto por otras vías (heces, fluido vaginal y calostro) que para las no excretoras en el mismo periodo (P=0,005). Es probable que en el momento del parto la bacteria se reactive y sea excretada al medio con más eficacia, seguramente debido a la inmunosupresión materna. La detección de estos animales excretoras de forma rutinaria, eficiente y a un coste razonable, así como conocer las repercusiones sanitarias y económicas asociadas a la excreción deberían ser objeto de futuras investigaciones.

Las conclusiones son que las vacas excretoras de la bacteria a través de heces, leche o fluidos vaginales al parto tienen más posibilidades de expulsar la bacteria a través de la placenta que las vacas no excretoras al parto. No se ha detectado en las 2 granjas del estudio ninguna relación entre la excreción de *C. burnetii* durante el preparto o al parto con la retención de placenta o terneros nacidos muertos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ben Amara, A., Ghigo, E., Le Prior, Y., Lépoland, C., Salcedo, S. P., Lemichez, E., Bretelle, F., Capo, C. and Mege, J. L. 2010. PLOS One 14. 5(12): e15315.
- García-Ispuerto, I., Nogareda, C., Yániz, J.L., Almería, S., Martínez-Bello, D., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., López-Gatius, F. 2010. Theriogenology. 74: 212-220.
- Guatteo, R., Beaudou, F., Joly, A., Seegers, H. 2007. Vet Res. 38: 849-860.
- Hansen, M.S., Rodolakis, A., Cochonneau, D., Agger, J.F., Christoffersen, A.B., Jensen, T.K., Agerholm, J.S. 2011. Vet J.
- Harris, R.J., Storm, P.A., Lloyd, A., Arens, M., Marmion, B.P. 2000. Epidemiol. Infect. 124: 543-549.
- Maurin, M., Raoult, D. 1999. Clin Microbiol. 12: 518-553.
- Porter S.R., Czaplicki G., Mainil J., Guatteo R., Saegerman C. Int J Microbiol. Doi: 10.1155/2011/248418. Epub 2011 Dec 13.
- To, H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K. 1998. J Vet Med Sci. 60: 859–861.
- Tutusaus, J., López-Gatius, F., Almería, S., Serrano, B., Monleón, E., Badiola, J.J., García-Ispuerto, I. 2013. Acta Vet Hung. (aceptado para publicación).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por una beca UDL y por CEVA Santé Animale C10069.

Tabla1. Relación de muestras PCR positivas en función del momento de muestreo y la naturaleza de las mismas.

Tipo de muestra	171-177 días preparto	Día del parto	En los dos periodos
Fluido vaginal	2 2,6%	14 18%	0
Heces	3 3,8%	5 6,4%	0
Leche/calostro	8 10,3%	2 2,6%	3 1,9%
Cotiledones		13 17%	

RELATIONSHIP BETWEEN *COXIELLA BURNETII* SHEDDING IN FAECES, MILK AND VAGINAL FLUID AT PARTURITION AND THE PRESENCE OF BACTERIUM IN PLACENTAL COTYLEDONS

ABSTRACT: The aim of this study was to analyze the relationship between *Coxiella burnetii* in the cotyledons at parturition and placenta retention, stillborns, *C. burnetii* seropositivity and shedding by other routes during days 171-177 of pregnancy and at parturition in dairy cows. Two herds in northeastern Spain provided 78 cows that were sampled at 171-177 days of pregnancy and at parturition. Samples of blood, faeces, milk, vaginal fluid, and cotyledons were collected for the specific antibodies detection in blood by indirect ELISA and *C. burnetii* DNA detection by quantitative PCR in the remaining samples. The seroprevalence during pregnancy and % of PCR positive samples was 52.6% and 8.6%, respectively. All cows delivered at term. No significant links were found in the study by logistic regression between retained placenta, stillborn calves, *C. burnetii* seropositivity and shedding on days 171-177 of gestation with the presence of *C. burnetii* in cotyledons. However, according to the odds ratio, the probability to present positive PCR cotyledons at parturition is 10.3 times higher in shedding cows at parturition by other routes than non-shedders in the same period ($P = 0.005$). In conclusion, *C. burnetii* shedding cows at parturition are more likely to have the bacterium in the cotyledons than non-shedders.

Keywords: *Coxiella burnetii*, cattle, cotyledons

INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON SALMONELLA ENTERICA SUBSP. DIARIZONAE SEROTIPO 61:K:1:5:(7) EN CORDERAS.

Figueras, L.^{1,2}, Lacasta, D.¹, Ferrer, L.M.¹, Ramos, J.J.¹, Bueso, J.P.³, De las Heras, M.¹,
¹Ortega, M.², González, J.M.², Espada, M.^{1,2}, Ruiz de Arcaute, M.^{1,2}

¹Facultad de Veterinaria, ²Gabinete Técnico Veterinario S.L., ³Laboratorio Agroambiental de Zaragoza. luisfiguerasgtv@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La rinitis crónica proliferativa (RCP) es una inflamación del tracto respiratorio superior del ganado ovino con un curso lento y de final fatal. En la bibliografía la rinitis crónica en ovino se relaciona con varios patógenos como virus, parásitos u hongos. De acuerdo con los trabajos publicados por Meehan *et al.* (1992) y Lacasta *et al.*, (2012) se ha encontrado una estrecha asociación entre la rinitis crónica proliferativa en ovino con el aislamiento laboratorial en cultivo puro de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1:5:(7). (SED) En esta comunicación se expone la infección experimental en corderos libres del patógeno con el fin de conocer mejor la etiopatogenia de la rinitis crónica proliferativa y confirmar que este patógeno es el causante de la RCP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante 12 meses se trabajó con un total de 15 corderas, libres del patógeno, las cuales se distribuyeron en dos grupos mantenidos en alojamientos totalmente independientes desde el inicio del proyecto. Once animales fueron inoculados con SED y cuatro animales fueron destinados al grupo control. La edad de todos los animales al inicio del proyecto fue de 3-4 meses. Cada animal del grupo infectado recibió 2 ml de un preparado, cada mililitro del preparado contenía $1-6 \times 10^9$ UFC.

Los animales se infectaron por tres métodos distintos. Un subgrupo, constituido por 5 animales, que recibió el inoculado mediante inyección intranasal directamente en el interior del cornete ventral; otro, formado por 5 animales, que recibieron el inoculado directamente por instilación nasal a través de los ollares mediante jeringuilla estéril, y un tercer subgrupo, formado por un animal, en el que se utilizaron simultáneamente ambas vías. El punto de inoculación fue la incisura nasoincisiva. Un animal del grupo control se inoculó con 2 ml del medio de suspensión del inoculado estéril mediante inyección directa intranasal en el interior del cornete ventral; el punto de inyección fue el mismo que en el grupo anterior. A los otros 3 animales, que completaban el grupo, no se les realizó ninguna acción.

Desde el primer día post-infección se realizaron inspecciones visuales diarias de todos los animales durante todo el tiempo que duró el estudio. A lo largo de la primera semana las exploraciones diarias fueron más metódicas, para ver todas las posibles reacciones de los animales, anotándose las posibles alteraciones tanto de comportamiento como de salud.

Además, se realizaron mensualmente hasta el final del estudio tomas de muestras de todos los animales presentes en la prueba de ambas fosas nasales, vagina y heces. Asimismo se tomaron muestras de suero y sangre entera para realizar una hematología completa, tomándose como referencia los valores descritos por Ramos *et al.* (2007).

A partir del cuarto mes de la inoculación se fueron eutanasiando animales y obteniendo muestras tanto de ambas fosas nasales, cornetes ventrales y nódulos linfáticos submandibulares, parotídeos y retrofaríngeos para su estudio microbiológico, anatomopatológico e inmuno-histoquímico. También se recogieron muestras de todos los órganos importantes e intestino delgado.

Para el estudio de todos los datos obtenidos se ha utilizado el paquete estadístico SPSS. Para el estudio de los síntomas se ha empleado la Chi-cuadrado de Pearson con la corrección de Fisher dado que el número de datos fue inferior a cinco en alguna de las casillas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera toma de muestras realizada cuatro días postinfección se aisló SED en todos los animales infectados al menos en una de las localizaciones muestreadas. Los animales del grupo control dieron todos negativos para cualquiera de las zonas muestreadas. En cuanto al estudio de los nódulos linfáticos regionales (submandibulares y parotídeos) el grupo infectado presentó aumento del tamaño de al menos uno de ellos en 9 de las 11

corderas, mientras que en el grupo testigo ningún animal presentó aumento de tamaño, siendo estadísticamente significativas estas diferencias ($P=0,011$).

Tras la primera exploración clínica, realizada dos semanas después de la inoculación de SED, se pudo comprobar que los parámetros de sintomatología estaban claramente alterados en los animales infectados respecto a los controles.

En la segunda exploración y posteriores la sintomatología clínica remitió ostensiblemente, sin embargo se mantuvo el incremento de tamaño de los nódulos linfáticos. Si se analiza el número de animales que tuvo aumento de tamaño en alguno de sus nódulos linfáticos durante algún momento del estudio se obtuvo que un 90% de los animales infectados tuvieron reacción en alguno de sus nódulos mandibulares y/o parotídeos presente en algún momento. Este análisis resulto altamente significativo ($P=0,005$).

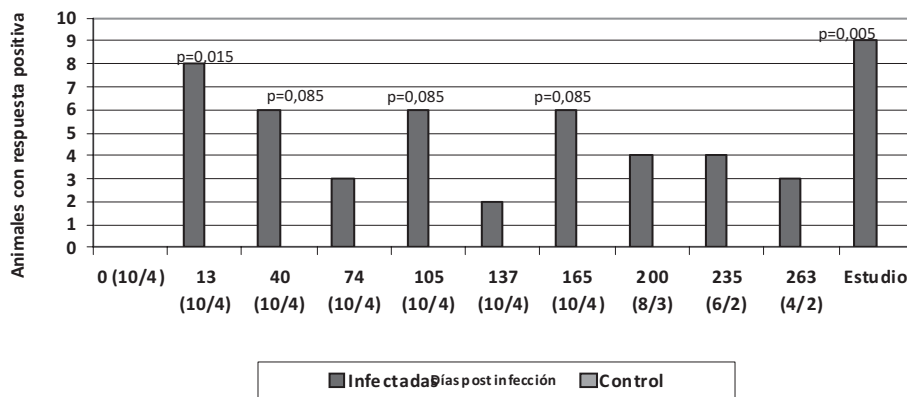


Figura 1: Número de animales con aumento del tamaño de los nódulos linfáticos (submandibular y/o parotídeos) según los días post infección y total de animales que presentaron aumento de tamaño de los nódulos en algún momento del ensayo (Estudio).

Cuando se analizaron los aislamientos microbiológicos de ambas fosas nasales en conjunto, durante el período comprendido entre la 3ª y la 7ª exploración, se consiguieron aislamientos positivos de SED, del 100% de los animales infectados.

Si se hace un análisis comparativo de animales con aumento del tamaño de los nódulos linfáticos submandibulares y parotídeos con el número de animales que presentaron aislamiento positivo de SED en fosas nasales en conjunto se puede apreciar que existe una estrecha relación entre ambas, coincidiendo perfectamente el mayor aumento de tamaño de los nódulos con los momentos de mayores aislamientos. También puede observarse un mayor incremento del tamaño de los nódulos submandibulares inicialmente que con el paso de los días va equiparándose con el aumento de tamaño de los nódulos parotídeos. A partir los 200 días post infección disminuyen el número de animales con nódulos aumentados y con aislamiento positivo, sin embargo éstos siguen siendo el 50% y el 83.3% de los animales presentes en esos momentos.

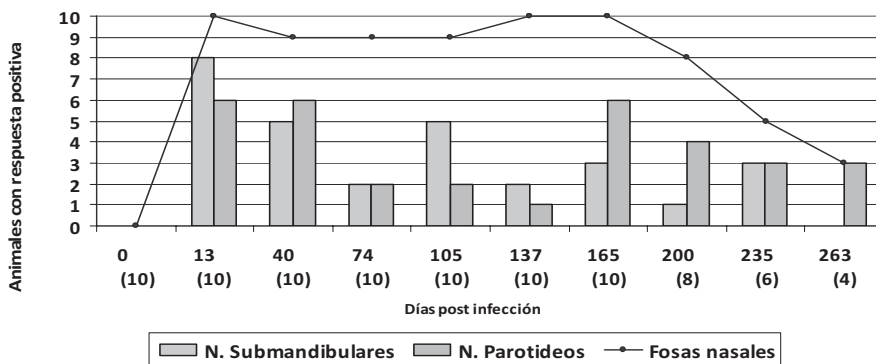


Figura 2: Comparativa de animales con aumento del tamaño de los nódulos linfáticos submandibulares y parotídeos según los días post infección y total de animales que presentaron aumento de tamaño de los nódulos en algún momento del ensayo (Estudio) con el número de animales que presentaron aislamiento positivo de SED en fosas nasales en conjunto.

En el análisis microbiológico de los animales necropsiados y muestreados el 83,3% (5/6) de los animales infectados presentaron al menos un aislamiento positivo.

Sin embargo, el estudio anatomopatológico macroscópico de los órganos y de las zonas muestreadas no ha puesto en evidencia ninguna lesión. Tampoco se consiguió evidenciar lesiones de rinitis crónica proliferativa en el estudio anatomopatológico microscópico en las muestras tomadas de los cornetes ventrales de los animales infectados necropsiados. Del mismo modo, las técnicas de inmunohistoquímica resultaron también negativas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la adaptación de SED a las zonas altas del tracto respiratorio del ganado ovino, así como la incapacidad de los animales para vencer la infección.

El hecho de no conseguir reproducir los síntomas de rinitis crónica proliferativa, al menos durante el primer año, nos hace pensar que puede que la RCP sea una enfermedad de curso más lento o que para que se reproduzcan los síntomas sean necesarios otros factores (inmunosupresión, asociación con otros patógenos, alteraciones del epitelio de la cavidad nasal).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Meehan, J.T., Brodgen, K.A., Courtney, C., Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., (1992). Chronic Proliferative Rhinitis associated with *Salmonella arizonae* in Sheep. *Vet Path* 29:556-559.
- Ramos, J.J. Ferrer, L.M. (200). Exploración clínica del ganado ovino y su entorno. Asis Biomedica. Zaragoza.
- Lacasta, D.; Ferrer, L.M.; Ramos, J.J.; Bueso, J.P.; Borobia, M.; Ruiz de Arcaute, M.; Figueras, L.; González-Sainz, J.M.; De Iñs Heras, M. (2012) Chronic proliferative rhinitis associated with *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1:5:(7) in sheep in Spain. *J Com Path* 2012 Vol. (in press)

EXPERIMENTAL INFECTION OF LAMBS WITH *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *DIARIZONAE* SEROTYPE 61:K:1:5:(7)

ABSTRACT: Chronic proliferative rhinitis is an inflammation of the upper respiratory tract with slow and lethal clinical course. It has been associated with *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1:5:(7) (SED) in ovine. This pathogen is a host adapted microorganism in sheep. This communication reports the experimental infection of the upper respiratory tract of lambs with SED.

Keywords: Ovine, Chronic proliferative rhinitis, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1:5:(7), experimental infection

PAPEL DE LA FAUNA SILVESTRE EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS PORCINA EN CEBADEROS

Andrés, S.¹, Vico, JP.¹, Samper, S.², Garrido, V.³ y Mainar-Jaime, RC.*⁴

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930. 50059 Zaragoza; ²IIS Aragón, Laboratorio Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet. 50009 Zaragoza; ³Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra). 31006. Pamplona ⁴Dpto. de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 50013 Zaragoza.

*E-mail: rcmainar@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis ocupa la segunda posición en el listado de zoonosis por transmisión alimentaria de la Unión Europea (EFSA, 2012) y la carne de cerdo se considera la segunda fuente más importante de esta infección humana. El éxito de los programas de control de la salmonelosis porcina en las explotaciones se basa en disponer de un conocimiento adecuado de su epidemiología. Aunque la principal fuente de salmonelosis en el porcino son los propios cerdos infectados asintóticamente, las aves silvestres y los pequeños mamíferos, especialmente aquellos que comúnmente frecuentan las explotaciones ganaderas, podrían actuar como reservorios naturales de *Salmonella* spp. y jugar así un papel fundamental en la epidemiología de esta infección. El objetivo de este trabajo es estudiar, en un área de alta prevalencia de salmonelosis porcina (Aragón), los posibles vínculos entre la infección en animales silvestres y en el ganado porcino de cebo, mediante el estudio de las relaciones fenotípicas y genotípicas entre aislados de *Salmonella* spp. obtenidos de esas especies animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las explotaciones porcinas se seleccionaron en función de las posibilidades existentes para la captura de pájaros. En cada explotación se disponían redes de captura en zonas transitadas por las aves y se colocaban cepos para atrapar roedores. También se recogían muestras de heces frescas de cerdos de los cebaderos (en *pooles* de 4 muestras individuales) y muestras ambientales (principalmente heces de aves y roedores) de lugares a los cuales los cerdos no tenían acceso (ventanas, muros, etc.). Las aves capturadas se colocaban, privadas de luz, en jaulas estériles hasta que defecaban, tras lo cual se identificaban, anillaban y se soltaban. Las heces se recogían mediante hisopos para su análisis laboratorial. En función del número y especies capturadas las muestras se podían analizar como *pooles* o individualmente. Se muestrearon también aves de entornos naturales alejados de explotaciones porcinas con el fin de comparar su prevalencia de salmonelosis con la de las aves capturadas en los alrededores de explotaciones porcinas.

La detección de *Salmonella* spp. se realizó siguiendo la norma ISO 6579:2002. Las cepas de *Salmonella* aisladas se enviaron al Centro Nacional de Referencia de Salmonelosis Animal en Algete, Madrid, para su serotipado. La técnica de Kirby-Bauer se utilizó de acuerdo con las recomendaciones de los estándares internacionales (CLSI/NCCLS, 2005) para determinar los patrones de sensibilidad frente a un panel de 10 antimicrobianos recomendados por la normativa europea (DOUE, 2007) (i.e. ácido nalidíxico, ciprofloxacino, cefotaxima, ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, gentamicina, sulfisoxazol, trimetoprima, y tetraciclina). El genotipado de las muestras se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) siguiendo el protocolo estandarizado de PulseNet, con modificaciones de Ribot *et al.*, 2006. Como marcador de peso molecular se empleó *Salmonella* Braenderup H9812 (Hunter *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se muestrearon un total de 44 explotaciones porcinas situadas en las provincias de Huesca y Zaragoza. En 30 (68%) de ellas se aisló *Salmonella* en alguna de las muestras tomadas. Los resultados globales del muestreo se presentan en la Tabla 1. Algo más de un 50% de las explotaciones muestreadas presentaron muestras de porcino positivas a *Salmonella* spp., un porcentaje similar al de explotaciones con muestras ambientales positivas a este

agente patógeno. Es destacable que más de un 25% de las muestras ambientales recogidas, formadas principalmente por heces de aves y roedores, fueron positivas a *Salmonella* spp., un porcentaje muy superior al observado cuando las muestras se obtuvieron directamente de la captura de estos animales.

La prevalencia fue significativamente mayor (Odds Ratio=16,5; IC95%=5,2-52,6; P<0,01) en las muestras de aves capturadas en las inmediaciones de cebaderos, siendo *S. Typhimurium* el serotipo más frecuente en aves. En el 44% de las explotaciones donde se aisló *Salmonella* tanto de porcino como de aves silvestres se observó una relación filogenética entre cepas procedentes de estas especies animales (Figura 1). Este porcentaje fue similar (43%) en el caso de las muestras ambientales, pero muy superior (80%) en el caso de los roedores.

La gran mayoría (94,4%) de las cepas aisladas a partir de heces de porcino presentaron algún tipo de resistencia antimicrobiana (RA) (Tabla 2). Por el contrario, las cepas procedentes de aves silvestres fueron mayoritariamente sensibles a los antibióticos (74%), y cuando presentaron RA, el patrón generalmente coincidía con el observado en las cepas de *Salmonella* aisladas a partir de muestras de cerdos de la explotación correspondiente. Las cepas obtenidas a partir de roedores presentaron niveles de RA también elevados (78%) y, además, en el 66% de las explotaciones el patrón de RA coincidía con el observado en muestras de cerdos de esas mismas explotaciones. Esta observación junto con los resultados de homología de las cepas de roedores y cerdos sugiere un contacto mucho más estrecho de los cerdos con estos que con las aves.

Las muestras ambientales mostraron unos mayores niveles de RA (75,8%) (Tabla 2), lo que podría deberse a que este tipo de muestras (mayoritariamente heces de aves y roedores) hubieran sufrido una contaminación secundaria con cepas de *Salmonella* circulantes por la explotación (en el ambiente, aire) en vez de estar originalmente contaminadas. De las 23 granjas positivas a *Salmonella* en heces de porcino, 21 (91,3%) presentaron multiresistencia y sólo 2 resultaron sensibles a todos los antibióticos analizados. En estas dos explotaciones, los aislados de *Salmonella* obtenidos a partir de aves, roedores y ambiente también resultaron sensibles a todos los antibióticos testados.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que 1) las granjas porcinas actuarían como facilitadoras de la transmisión de la salmonelosis entre las aves silvestres independientemente del origen primario de la infección (aves o porcino); 2) el grado de congregación de aves podría tener mucho que ver en la transmisión de la infección ya que la relación genética entre aislados de diferentes especies de aves se observó en explotaciones donde las aves eran muy abundantes; 3) las cepas aisladas de roedores mostraron una gran relación con las aisladas de cerdos, indicando la importancia de estos animales como factores de riesgo y/o mantenimiento de la infección en las explotaciones; 4) todos estos resultados aportan información epidemiológica muy práctica a la hora de plantear medidas de control de esta infección en las explotaciones, que deberían estar basadas en estrictas medidas de higiene y bioseguridad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EFSA. 2012. EFSA J. 10:2597•CLSI/NCCLS. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th. Ed. NCCLS, Wayne, Pa. •DOUE. 2007. Diario Oficial de la Unión Europea C:2421•Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J. 2006. Foodborne Pathog Dis 3:59-67•Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van Duynne, M.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T., Ribot, E. 2005. J Clin Microbiol 43:1045-1050.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en su totalidad por el INIA (FAU2008-16).

Tabla 1. Resultados generales de prevalencia a *Salmonella* spp. en los diferentes tipos de muestras recogidas

Muestra	Nº expl.	Nº explot. + (%)	Nº muestras / nº individuos	Nº muestras + (%) / nº mínimo-máximo de indiv. + (%)
Heces porcino	41	23 (56)	397 / 1588	54 (13,6) / 54-216 (3,5-13,6)
Aves	42	9 (21,43)	682 / 1453	27 (3,96) / 27-124 (1,86-8,53)
Roedores	13	5 (38,46)	88 / 88	9 (10,23)
Ambientales	41	21 (51,22)	135 / na	32 (23,7)
Heces aves	32	15 (46,88)	62 / na	20 (32,26)
Heces roedores	26	7 (26,92)	41 / na	8 (19,51)
Silos	21	3 (14,29)	32 / na	4 (12,5)

Tabla 2. Prevalencia de resistencia a los antimicrobianos en los aislados de *Salmonella* spp. procedentes de diferentes orígenes

	Muestras +	Resistentes (%)	Multirresistencia* (%)
Heces porcino	54	51 (94,4)	50 (92,6)
Aves	27	7 (26)	6 (22,2)
Roedores	9	7 (78)	6 (66,7)
Ambientales			
Heces aves	20	18 (90)	11 (55)
Heces roedores	8	7 (87,5)	7 (87,5)
Silos	4	4 (100)	4 (100)

*A más de dos antibióticos

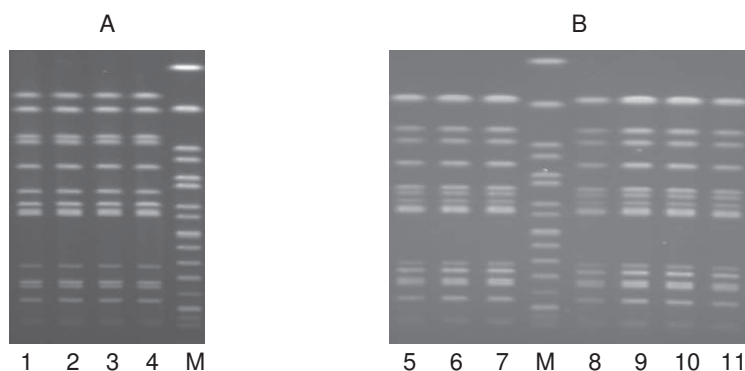


Figura 1. Patrones de PFGE generados por el enzima *Xba*I en cepas de *S. Typhimurium* procedentes de dos explotaciones (A y B) a partir de muestras de diferentes orígenes. Líneas: M (marcador): *S. Braenderup* H9812; 1: ave; 2 y 3: roedor; 4: heces de cerdo; 5 y 6: heces de cerdo; 7, 8, 9 y 10: ave; 11: ambiente.

ROLE OF WILDLIFE IN THE EPIDEMIOLOGY OF SALMONELLOSIS IN FINISHING PIGS

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the potential relationship between *Salmonella* infection in wildlife and pigs. Feces from pigs, small rodents, wild birds and other environmental samples from 44 finishing farms were cultured for *Salmonella* isolation. In 30 (68%) farms *Salmonella* was isolated. Out of 122 *Salmonella* isolates found, 80 (63%) were Typhimurium and its monophasic variant. In 13 (43%) farms the same *Salmonella* serotype was isolated from samples from different origins and similar AR and PFGE patterns were found, which would support the existence of a transmission cycle of *Salmonella* infection between wildlife and pigs in this area.

Keywords: *Salmonella*, finishing pigs, wildlife.

SALMONELOSIS EN PORCINO REPRODUCTOR DE NAVARRA

Garrido¹, V., Sánchez¹, S., San Román¹, B., Zabalza-Baranguá¹, A., Grilló^{1*}, M.J.

¹Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra), Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona. *E-mail: mariajesus.grillo@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es la segunda zoonosis más frecuente de la Unión Europea (UE), asociada mayoritariamente al consumo de productos derivados del pollo y del cerdo (EFSA y ECDC, 2012). Para preservar la salud de los consumidores, la UE ha propuesto realizar controles exhaustivos en todas las fases de la producción porcina “de la granja a la mesa”, realizando diversos estudios de prevalencia, tanto en granjas (con heces de cerdas reproductoras) como en mataderos (con ganglios linfáticos mesentéricos -GLM- de cerdos de engorde). En función de los resultados obtenidos (EFSA, 2008; EFSA 2009), se van a establecer medidas de control de la salmonelosis porcina que podrían incluir restricciones en el comercio internacional de carne y productos del cerdo, para aquellos países que no cumplan los objetivos fijados de reducción de la prevalencia. Las cerdas reproductoras son consideradas como la principal fuente de infección del patógeno para los lechones. Sin embargo, no existen trabajos que determinen el estado infeccioso real de las reproductoras en GLM, que indicaría un papel activo en la transmisión del patógeno, como excretoras intermitentes del patógeno, a través de las heces.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el año 2011, el censo total de cerdas reproductoras en la C.F. de Navarra era de 65.308 animales, el 58% de las cuales se encontraban agrupadas en tan sólo 16 explotaciones con más de 1.200 hembras por explotación (Figura 1). Para determinar la prevalencia de *Salmonella*, se analizaron 13 de estas 16 explotaciones de gran tamaño, a razón de 15-20 hembras por explotación, hasta un total de 239 cerdas representativas de las 37.964 cerdas del sistema de producción intensiva de Navarra. Se tomaron muestras de GLM tras el eviscerado en el matadero, para el aislamiento y serotipado de *Salmonella* siguiendo la Norma ISO 6579:2002/Amd1:2007 (ISO, 2007). Tras el serotipado según el esquema de Kauffmann-White (Grimont y Weill, 2007), en el Centro Nacional de Referencia para Salmonelosis Animales (Algete, Madrid), las cepas de *S. Typhimurium* fueron enviadas al Instituto de Salud Carlos III (Madrid), para su fagotipado con los 38 fagos de referencia. Además, se analizaron los perfiles de resistencia antimicrobiana (RA), mediante la técnica de Kirby-Bauer (CLSI, 2005) frente a los 12 antimicrobianos recomendados por la UE en los programas de vigilancia epidemiológica armonizada de las salmonelosis animales (DOUE, 2007). Para simplificar la interpretación de los resultados, los distintos agentes analizados se agruparon por familias de antibióticos, según la nomenclatura internacional (OIE, 2009) i.e., Aminopenicilinas, como ampicilina o amoxicilina, solos o combinados con un inhibidor de betalactamasas como el ácido clavulánico (A); Fenicoles como el cloranfenicol (C); Aminoglucósidos como estreptomomicina y gentamicina (S); Sulfamidas como sulfisoxazol y Diaminopirimidinas como trimetoprim, solos o combinados entre sí (Su); Tetraciclinas (T); Quinolonas como ácido nalidíxico (Na) y ciprofloxacino; Cefalosporinas de Tercera Generación como cefotaxima (C3G). Las cepas se clasificaron como susceptibles, intermedias o resistentes, según el tamaño de los halos de inhibición siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio para cada antibiótico (CLSI, 2005). Como controles de cada experimento se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Typhimurium* DT104. Además, se determinó la prevalencia serológica de salmonelosis en esta población de reproductoras, a partir de 212 muestras de sangre recogidas en el momento del sacrificio en matadero utilizando un ELISA comercial Herd Check Swine *Salmonella* (IDEXX).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aisló *Salmonella* spp. en un total de 16 (6,7%) animales, pertenecientes a 6 (46,1%) de las explotaciones muestreadas. La media de infección en las granjas con al menos un animal positivo fue del 14,5%, aunque en la mayoría (5/6) de estas explotaciones la prevalencia media fue del 11,1%, aislándose *Salmonella* en 3 ó menos de los animales

analizados (Tabla 1). Tan sólo una explotación mostró mayor nivel de infección, con un 30% (6/20) de las cerdas infectadas (Tabla 1). Este es el primer estudio realizado en GLM de cerdas reproductoras, por lo que no existen resultados exactamente comparables. Los estudios de referencia en cerdas de la UE se realizaron con muestras de heces en pool que, por lo tanto, no permiten determinar la prevalencia individual de *Salmonella*. En estos estudios, se detectó la presencia de *Salmonella* en el 64% de las granjas de reproductoras de nuestro país (EFSA, 2009), porcentaje superior al encontrado en los GLM de nuestro estudio. Esta diferencia puede ser debida bien a una mayor prevalencia real o a la presencia de *Salmonella* en heces, sin excreción activa del patógeno a partir de la infección ganglionar. No obstante, la importancia de las madres como transmisoras del patógeno a los lechones reside en la presencia del patógeno en GLM y su excreción intermitente a través de las heces. Los estudios de infección por *Salmonella* en GLM realizados en cerdos de engorde indican que *Salmonella* está presente en aproximadamente un 30% de los cerdos de engorde que llegan a matadero, tanto en España (EFSA, 2008) como en Aragón (Vico et al., 2011). Esta prevalencia de la infección es muy superior a la detectada en las reproductoras de Navarra, lo que podría sugerir la existencia de fuentes de infección durante el cebo más importantes que la transmisión materna o menor prevalencia de salmonelosis en el porcino de engorde de Navarra (trabajo en elaboración). Casi la mitad (7/16) de las cepas aisladas fueron *S. Typhimurium* de los fagotipos DT104B, DT193 y DT195, destacando la amplia distribución del fagotipo DT104B entre los animales de una misma explotación, así como la presencia de *S. Enteritidis* (serotipo generalmente asociado a las aves) en el 12,5% de las muestras infectadas (Tabla 1), como potencial fuente de contaminación de las canales de cerdo y transmisión al ser humano. En conjunto, el 56,3% de las cepas presentó RA algún agente (al menos, 5 antibióticos) de 3 familias diferentes, siendo el perfil A-C-S-Su-T, asociado al fagotipo DT104B, el más aislado (Tabla 1). Estos resultados de RA contrastan drásticamente con los obtenidos en porcino de engorde de Aragón, donde el 73,4% de las cepas presentaban RA a algún agente (Vico et al., 2011). Finalmente, el ELISA utilizado identificó como positivas el 100% de las granjas y el 95,2% de los animales. Considerando el punto de corte 40%, continuaban siendo positivas el 100% de las granjas y se reducía el número de animales positivos hasta el 41%. Estos resultados indican unos niveles de seroprevalencia muy superiores a los niveles de infección detectados por bacteriología (6,7%), lo que sugiere una falta de especificidad del test ELISA, que podría reflejar únicamente la existencia de un contacto antigénico anterior con el patógeno, pero no el estado infeccioso real de estos animales. Los estudios realizados en cerdos de engorde también indican una falta de correlación entre la serología y la existencia de infección, al nivel individual, aunque tienen cierta utilidad diagnóstica al nivel de granja (Vico et al., 2010). En el caso de las cerdas reproductoras, con una vida productiva más larga, las posibilidades de contacto antigénico con *Salmonella* y otros patógenos que podrían generar reacciones serológicas cruzadas, son mayores que en el ganado de engorde, por lo que los tests de diagnóstico serológico parecen tener menor utilidad para el diagnóstico y control de la salmonelosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLSI. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th. ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- DOUE. 2007: Commission Decision of 12 June 2007 on a Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* in poultry and pigs. 2007/407/EC. Official Journal of the European Union.
- EFSA. 2008. Report of the Task Force on Zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs. Part A. *EFSA J* 135: 1-111.
- EFSA. 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J* 7: 93 pp.
- EFSA & ECDC. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA J* 10: 2597.
- Grimont, P. A., F. X. Weill, 2007: Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In: I. P. a. WHO. (ed.). Institute Pasteur and World Health Organization. Collaboration Centre for Reference Research on *Salmonella*.
- ISO. 2007. International Organisation for Standardisation. ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. Geneve, Switzerland.
- OIE. 2009. List of antimicrobials of veterinary

importance http://web.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf. • Vico, J. P., Engel, B., Buis, W. G., Mainar-Jaime, R. C. 2010. J Zoonoses and Public Health 57 Suppl 1: 107-114. • Vico, J. P., Rol, I., Garrido, V., San Román, B., Grilló, M. J., Mainar-Jaime, R. C. 2011. J Food Protect 74: 1070-1078.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Departamento de Innovación, Empresa y Empleo del Gobierno de Navarra (IIQ14064.R11) y el Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias (CAM2011030054). Los contratos han sido financiados por UPNA (V.G. y A.Z.B.), CSIC (Programa JAE-Doc; B.S.R.) y Programa EMUNDUS18 (S.S.).

Tabla 1. Serotipos y perfiles de resistencia antimicrobiana (RA) de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas en GLM de cerdas reproductoras de Navarra.

Explotación (animales positivos/analizados)	Serotipo / Fagotipo (No. cepas)	Perfil RA (No. cepas) ^a
1 (6/20)	<i>S. Typhimurium</i> / DT104B (5)	A-C-S-Su-T (5)
	<i>S. Rissen</i> (1)	Sensible (1)
2 (3/20)	<i>S. Montevideo</i> (2)	Sensible (2)
	<i>S. Muenchen</i> (1)	Sensible (1)
3 (3/15)	<i>S. Derby</i> (2)	S-Su-T (2)
	<i>S. Enteritidis</i> (1)	Sensible (1)
4 (2/20)	<i>S. Typhimurium</i> / DT195 (1)	A-S-Su-T-Na-C3G (1)
	<i>S. Derby</i> (1)	S-Su-T (1)
5 (1/20)	<i>S. Typhimurium</i> / DT193 (1)	Sensible (1)
6 (1/15)	<i>S. Enteritidis</i> (1)	Sensible (1)
Total: 6 granjas	6 serotipos / 3 fagotipos (16)	3 perfiles RA (9)

^aFamilias de antimicrobianos: A: Aminopenicilinas; C: Fenicoles; S: Aminoglucósidos; Su: Sulfamidas; T: Tetraciclinas; Na: Quinolonas; C3G: Cefalosporinas de Tercera Generación.

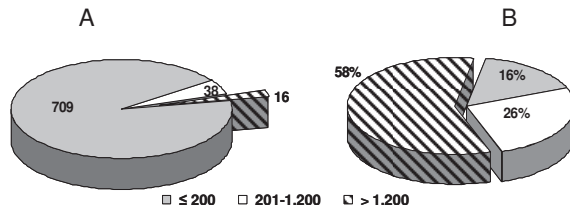


Figura 1. Distribución del censo de cerdas reproductoras de Navarra, en 2011. Número de explotaciones (A) y porcentaje de cerdas (B), según el tamaño de las explotaciones.

SALMONELLOSIS IN SOWS OF NAVARRA

ABSTRACT: The presence of *Salmonella* was studied by the ISO 6579:2002/Amd 1:2007, in mesenteric lymph nodes of a representative population of Navarra's sows (i.e. 239 sows from 13 farms, representing 58% of the total sow census and 81% of farms with more than 1,200 sows/farm). As result, 6.7% of animals were found infected, in 6/13 (46.1%) of farms analysed, showing most of these farms around an 11% of prevalence. About half (7/16) of the strains isolated were *S. Typhimurium* phage-type DT104B, DT195 or DT193, showing multiple antimicrobial resistance (AR) patterns. Serotype Enteritidis, mainly associated to poultry, was found in the 12.5% of the infected sows. The 56.6% of strains showed AR to, at least, 5 agents, being the classical A-C-S-Su-T family AR profile the most frequently found. Also, the seroprevalence was determined by a commercial ELISA test, showing that 100% of farms and 95.2%-41% of sows, according to the cut-off adopted, were positive to salmonellosis. This result wide disagrees with the bacteriological findings, suggesting a limited value of serological tests for *in vivo* monitorization of sow salmonellosis.

Keywords: *Salmonella*, sows, prevalence, antimicrobial-resistance.

DESARROLLO DE PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OVINOS INMUNIZADOS CON VACUNAS-GFP

Zabalza¹, A., San Román¹, B., Muñoz², P.M., Blasco², J.M., Grillo^{1*}, M.J.

¹Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra), Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona. ²CITA de Aragón, 50059 Zaragoza. *E-mail: mariajesus.grillo@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

La vacunación es la estrategia más utilizada para controlar las enfermedades animales. Sin embargo, las vacunas veterinarias pueden interferir en el diagnóstico serológico, dificultando la diferenciación entre los animales vacunados e infectados (DIVA). Para solucionar este problema en el ámbito de la brucelosis animal, nuestro grupo está desarrollando nuevas vacunas, marcadas genética y antigénicamente con la proteína verde fluorescente (GFP) así como tests de diagnóstico asociados. Además de permitir la identificación directa de la cepa vacunal, mediante iluminación UV o microscopía de fluorescencia, la proteína GFP presenta la ventaja de ser de origen marino y por tanto diferente antigénicamente de cualquier proteína conocida en animales de vida terrestre o bacterias, por lo que puede utilizarse como marcador xenogénico de vacunas de *Brucella* (Chacón-Díaz *et al.*, 2011). Así, la respuesta inmunológica de los animales inmunizados con vacunas-GFP podría diferenciarse de la producida en los infectados por cepas de campo, por presentar anticuerpos tanto frente a antígenos del patógeno como frente a la proteína marcadora GFP (Chacón-Díaz *et al.*, 2011). El objetivo del presente trabajo fue poner a punto dos técnicas de diagnóstico serológico, Doble Difusión en Gel (DDG-GFP) y ELISA-indirecto (ELISA-GFP), para su aplicación junto con vacunas-GFP en el control de la brucelosis ovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar, se obtuvieron dos tipos de proteína: (i) GFP-GST producida en la fracción soluble del sistema de expresión *E. coli* XL1-Blue pGEX-4T-1-*gfpmut3* (Kingston y Brent, 1990) y purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas GE Healthcare; y (ii) GFP obtenida por escisión enzimática con trombina (37°C, 36 horas, 40 unidades/mg proteína) a partir de GFP-GST. Ambas proteínas fueron cuantificadas, mediante el test de Bradford (Bradford, 1976) y caracterizadas, mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie (Fairbanks *et al.*, 1971) o de Plata Alcalina (Tsai y Frasch, 1982) y Western-Blot anti-GFP (San Román *et al.*, 2012).

A continuación, ambas proteínas se utilizaron para obtener sueros ovinos hiperinmunes anti-GFP-GST y anti-GFP, para su posterior uso como controles positivos en la puesta a punto de los tests de diagnóstico serológico. Para ello, grupos de 3 corderos de 3-4 meses de edad fueron inmunizados, 3 veces consecutivas (a 0, 4 y 6 semanas) por vía subcutánea, con 375 µg/cordero de GFP-GST ó 187,5 µg/cordero de GFP, en adyuvante incompleto de Freund. Como control, se utilizó un grupo de corderos (n=3) inoculados sólo con el adyuvante diluido en PBS. Dos semanas después de la última inmunización, se obtuvo suero sanguíneo de todos los animales. La presencia y título de los anticuerpos obtenidos se determinó, mediante DDG con diferentes concentraciones de GFP-GST y GFP como antígeno.

Para la prueba de DDG-GFP, se determinó la cantidad óptima de GFP a utilizar como antígeno, como aquella que permitía detectar anticuerpos en todos los sueros hiperinmunes y generaba una banda de precipitación equidistante entre los pocillos del suero y del antígeno. El ELISA-GFP se diseñó siguiendo los protocolos descritos previamente (Crowther, 2001, Chacón-Díaz *et al.*, 2011) y analizando los siguientes parámetros: i) utilidad de ambas proteínas como antígenos, mediante tapizado de placas Maxisorp® (Nunc) con GFP-GST (10 µg/mL) o GFP (5 y 10 µg/mL) diluidas en PBS-Tween20; ii) efecto del bloqueo de reacciones inespecíficas, mediante incubación (37°C, 1 hora) con leche desnatada al 2% en PBS-Tween20; iii) dilución óptima del suero, mediante diluciones seriadas, entre 1:60 y 1:61440, de los sueros hiperinmunes; iv) dilución óptima (1:2000 ó 1:4000) del anticuerpo secundario proteína G - Peroxidasa; y v) tiempo óptimo (0, 15 ó 30 minutos) de incubación del sustrato ABTS. Como controles negativos se utilizaron los sueros de corderos (n=3) inoculados con adyuvante en PBS y de corderos sanos coetáneos (n=6) no inmunizados. Finalmente, para determinar la especificidad de la técnica, se analizó

mayor número (n=92) de sueros ovinos sanos y no inmunizados con GFP, en las condiciones del ELISA-GFP determinadas como óptimas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó la presencia de abundante proteína GFP-GST tanto en el pellet como el sobrenadante de los cultivos bacterianos, obteniéndose un total de 27 mg de GFP-GST y 7 mg de GFP, a partir de la fracción soluble de 66 mL de cultivo bacteriano, lo que supone un rendimiento de producción de 400 µg/mL. Estos datos demostraron la utilidad del sistema de expresión *E. coli* XL1-Blue utilizado, a los niveles de producción descritos con otras cepas de expresión ampliamente utilizadas, como *E. coli* BL21 o BLR (Terpe, 2006). Además, mediante SDS-PAGE, se observó una única banda de 55 kDa para GFP-GST y de 29 kDa para GFP (Fig. 1a), comprobándose que ambas proteínas se habían obtenido en pureza y conformación (resultado no mostrado) adecuadas para su posterior utilización. Todos los sueros ovinos obtenidos tras la hiperinmunización mostraron una clara reacción positiva en DDG, tanto frente a la proteína homóloga como a la heteróloga, con mayor intensidad en los sueros de los corderos hiperinmunizados con GFP y enfrentados a la misma proteína (Fig. 1b). Para la DDG-GFP, la concentración óptima de antígeno fue de 31,25 µg/mL de GFP, para ambas proteínas. En el ELISA-GFP, los resultados obtenidos mostraron que la proteína GFP-GST es más adecuada que GFP, para su uso como antígeno diagnóstico. De hecho, cuando se utilizó la proteína GFP para el tapizado de las placas, todos los sueros hiperinmunes presentaron baja o nula reactividad. Este hecho podría explicarse por: i) diferencias en la conformación o presentación de epitopos de GFP, tras la ruptura enzimática de GFP-GST en los sitios para la trombina; ii) condiciones de tapizado óptimas para GFP-GST, pero no para GFP; iii) adhesión de la proteína GFP a los pocillos dejando expuestas zonas poco inmunógenas, que limitarían las reacciones antígeno-anticuerpo; y iv) la existencia de anticuerpos anti-GST en los animales inmunizados con GFP-GST. Para descartar esta última posibilidad, se realizó un ELISA anti-GST, en el que todos los animales fueron negativos. Cuando se analizó el efecto del bloqueo de la reacción con 2% de leche se observó una notable disminución de la absorbancia de los sueros negativos, lo que indica que dicho paso era necesario para evitar resultados falso-positivos. Además, se determinó que las diluciones óptimas de suero eran 1:100 y 1:200, al permitir observar las mayores diferencias de absorbancia entre los sueros negativos y positivos. Para tratar de aumentar los valores de absorbancia de los sueros positivos, se estudió el efecto de una dilución (1:2000) menor del anticuerpo secundario proteína G-Peroxidasa. Sin embargo, este parámetro no modificó los resultados anteriores, por lo que se mantuvo como óptima la dilución 1:4000 del conjugado. Por último, se analizó el efecto del tiempo de incubación del ABTS, observándose que tras 15 y/o 30 minutos, según dilución de los sueros (Fig. 2a), aumentaban significativamente las diferencias en la reacción colorimétrica entre los sueros positivos y los negativos. Finalmente, en las condiciones de trabajo fijadas (antígeno GFP-GST, bloqueo de la reacción con leche 2%, dilución de los sueros a 1:100 y 1:200 e incubación del ABTS durante 15 y 30 minutos), los 92 sueros ovinos seleccionados como controles negativos indicaron que el ELISA-GFP poseía una especificidad del 99% (Fig. 2b).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M.M. 1976. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Chacón-Díaz, C., Muñoz-Rodríguez, M., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Grilló, M. J. & Moreno, E. 2011. Vaccine 29: 577-582.
- Crowther, J. 2001. Methods in molecular biology. The ELISA guidebook. New Jersey: Human Press Inc.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F. 1971. Biochemistry 10 (13): 2606-2617.
- Kingston, B. & Brent, R. 1990. Current Protocols in Molecular Biology.
- Terpe, K. 2006. Applied microbiology and biotechnology 72: 211-222.
- San Román, B., Garrido, V., Muñoz, P.M., Arribillaga, L., García, B., De Andrés, X., Zabaleta, V., Mansilla, C., Farrán, I., Lasa, I., De Andrés, D., Amorena, B., Lasarte, J.J., & Grilló M.J. 2012. Vet. Res. 43(1):31.
- Tsai, C. M. & Frasch C.E., 1982. Anal. Biochem. 119(1):115-119.

Agradecimientos: El trabajo ha sido financiado por el Programa de Cooperación Internacional CSIC-CRUSA (ref. 2010CR0005) y CICYT/MINECO (ref. AGL2011-30453-C04). A.Z. disfruta de una beca UPNA y B.S.R. de un contrato JAE-Doc del CSIC.

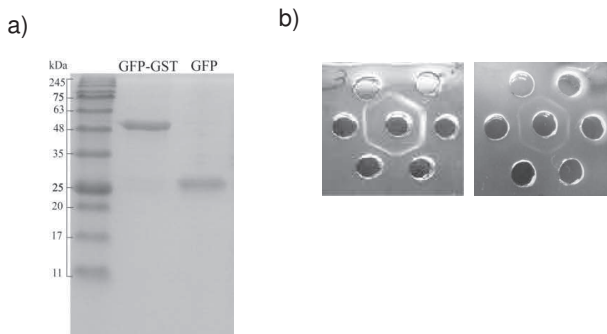


Figura 1. a) SDS-PAGE con tinción de Coomassie de las proteínas GFP-GST y GFP; b) Titulación en DDG de los sueros de corderos hiperinmunizados con GFP frente a su antígeno homólogo (izquierda) y heterólogo (derecha), colocando diluciones seriadas del suero en los pocillos exteriores y la concentración óptima del antígeno en el pocillo interior.

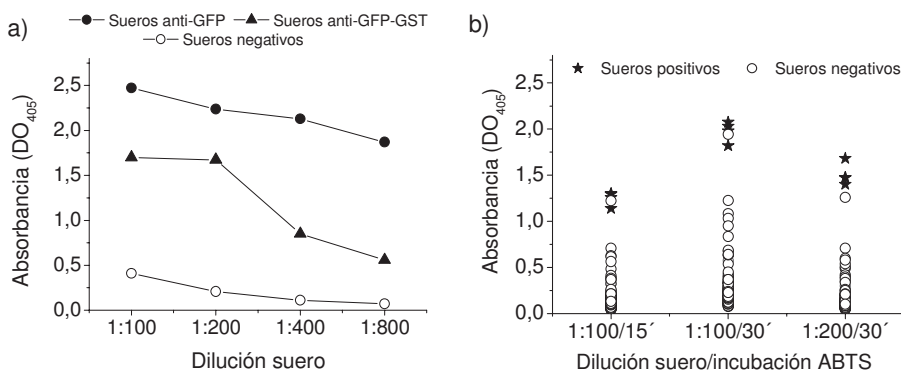


Figura 2. a) ELISA-GFP, tras 30 minutos de incubación con ABTS; b) Especificidad (n=92) del ELISA-GFP en distintas condiciones de dilución del suero ovino e incubación con ABTS.

DEVELOPMENT OF SEROLOGICAL TESTS FOR IDENTIFYING SHEEP IMMUNIZED WITH GFP-VACCINES

ABSTRACT: Serological interference in diagnostic tests is a major problem associated to the use of veterinary vaccines, hampering the differentiation between infected and vaccinated animals (DIVA). To solve this in the ovine brucellosis context, our group is developing new *Brucella* vaccines tagged with green fluorescent protein (GFP) as a xenogenic marker, to be used in combination with both classical and GFP DIVA-tests. The aim of this work was to develop serological tests (DDG-GFP and ELISA-GFP) to detect GFP antibodies in sheep. The optimal concentration of the proteins in DDG-GFP was that containing 31.25 µg/mL of GFP. In ELISA-GFP, GFP-GST fusion protein was more suitable than GFP as antigen. Moreover, other ELISA-GFP factors (blocking effect, serum and conjugate optimal dilutions, and time of ABTS substrate incubation) were evaluated, setting up an ELISA-GFP detecting all hyperimmune sera, and showing 99 % specificity when 92 negative sheep sera were tested. In conclusion, the serologic tests developed allowed to detect anti-GFP sheep antibodies, and could be useful along with recombinant GFP vaccines, as a DIVA strategy.

Keywords: DIVA, GFP, i-ELISA, DDG

EFICACIA DE DIVERSAS PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS PORCINA

Dieste-Pérez, L.¹, De Miguel, M.J.¹, Marín, C.M.¹, Barberán, M.², Blasco, J.M.¹, Muñoz, P.M.*¹ ¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930. 50059. Zaragoza (España). ² Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza *e- mail: pmmunnoz@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La brucelosis porcina causada por *Brucella suis* biovariedad 2 (*B. suis* bv.2) se considera una enfermedad emergente en toda Europa (Garin Bastuji *et al.*, 2000; Godfroid *et al.*, 2002) y se manifiesta clínicamente con abortos e infertilidad, ocasionando pérdidas económicas importantes en el sector porcino. El reservorio principal de la infección es el jabalí, cuyas poblaciones silvestres se hallan muy infectadas en la Península Ibérica (Muñoz *et al.*, 2010) y el resto de Europa (Garin Bastuji *et al.* 2000). Debido a la frecuente interacción del jabalí con el ganado porcino doméstico criado al aire libre, la infección se ha establecido endémicamente en el cerdo ibérico (Munoz *et al.*, 2003). Además, recientes brotes sugieren que podría tener importancia también en el porcino intensivo de nuestro país. Pese a ello, el ganado porcino es considerado oficialmente exento de esta enfermedad en toda la UE, por lo que tan solo los reproductores objeto de movimiento intracomunitario y de los centros de inseminación son sometidos regularmente a control obligatorio, utilizándose para ello las pruebas serológicas de Rosa de Bengala (RB), Fijación del Complemento (FC) o también, los ELISAs indirecto (ELISA-i) o de competición. Sin embargo, ninguna de estas pruebas es totalmente satisfactoria para el diagnóstico individual de la brucelosis porcina. Además de la baja sensibilidad diagnóstica de alguna de ellas (por ejemplo, la FC), su principal inconveniente radica en la existencia de Reacciones Serológicas Falsas Positivas (RSFP) inducidas por infecciones por otras bacterias gramnegativas que comparten determinantes antigénicos con la cadena O del lipopolisacárido liso (S-LPS) de *Brucella*, destacando particularmente *Yersinia enterocolitica* O:9. (EFSA 2009).

Puesto que los antígenos citosólicos presentes en el periplasma y citoplasma de *Brucella* (denominados genéricamente "brucelina") son específicos de este género bacteriano (sólo se hallan en otras bacterias de la clase alfa-Proteobacteria, y que no parecen afectar al ganado porcino), podrían utilizarse para diagnosticar la brucelosis y diferenciarla de las RSFP. Para ello es preciso utilizar extractos antigénicos totalmente libres de precursores biosintéticos de la cadena O, ya que la cepa más usada para la obtención de brucelina (*B. melitensis* 115 M) posee dichos precursores (Cloeckert *et al.*, 1992). Por el contrario, el mutante *B. abortus* manB_{core} carece de estos precursores (Monreal *et al.*, 2003) y cuando sus proteínas citosólicas son usadas como alérgeno en una prueba intradérmica, ésta resulta en una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la brucelosis porcina, incluso en presencia de RSFP (Dieste *et al.*, 2011). Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre el uso de estas proteínas citosólicas para el diagnóstico serológico de la enfermedad, y además, el extracto citosólico del mutante manB_{core} nunca ha sido evaluado para tal fin. El objetivo del presente trabajo consistió pues en la puesta a punto de diferentes pruebas serológicas con dicho extracto antigénico, y la evaluación de su eficacia diagnóstica en porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han puesto a punto las pruebas de Inmunodifusión en gel (DG), contraelectroforesis (CIE) y ELISA indirecto (ELISA-i), utilizando un extracto citosólico de la cepa *B. abortus* manB_{core} como antígeno y los protocolos descritos anteriormente (Muñoz *et al.*, 2005). En DG se usó también como antígeno S-LPS de *B. melitensis* 16M (Muñoz *et al.* 2005). Para DG y CIE se probaron diferentes concentraciones de antígeno (1,25-40 mg/ml), tampones (Borato, Veronal y Tris) conteniendo varias concentraciones de NaCl (0%, 5%, 10% y 20%) y distintas combinaciones voltaje/tiempo

(para CIE). Los geles se prepararon con el 1% de agarosa en ambos casos, utilizando agarosa de electroforesis (Sigma Aldrich) en DG y de baja electroendosmosis (Sigma Aldrich) para CIE. Las concentraciones óptimas de antígeno fueron 5 y 2.5mg/ml, respectivamente. La mejor eficacia se obtuvo usando tampón Borato (0.1M, pH 8.3) para la DG y tampón Veronal (20mM, pH 8.6) para la CIE, sin añadir NaCl. Los mejores resultados en CIE se obtuvieron realizando una primera lectura a las 3 horas tras la electroforesis (10 mA, 45 min.) y otra 24 h. después.

Para el ELISA-i se compararon distintos tampones (PBS y carbonato) para la fijación del antígeno y conjugados (anti IgG porcina monoclonal -Ingenasa SL- o policlonal -Nordic- y proteínas recombinantes A, G y A/G -Pierce-, todos ellos marcados con peroxidasa). La mejor eficacia se obtuvo usando Proteína G y siguiendo el protocolo descrito previamente (Muñoz *et al.* 2010), con ligeras modificaciones (dilución de suero 1/200 y lectura a los 30 minutos). Además, con el fin de optimizar la unión del antígeno a las placas de poliestireno (Nunc Maxisorp) y bloquear los sitios de unión inespecíficos de las proteínas se utilizó una solución estabilizante (SurModics).

Una vez determinadas las condiciones óptimas para cada prueba se evaluó su eficacia diagnóstica frente a una colección de sueros porcinos "Gold Standard". Para evaluar la sensibilidad diagnóstica (Se) se utilizó una población constituida por 169 sueros de cerdas infectadas naturalmente por *B. suis* bv. 2 (en todas ellas la infección se confirmó mediante aislamiento a partir de secreciones vaginales tras el aborto o de muestras de necropsia tras el sacrificio). La especificidad diagnóstica (Sp) se calculó utilizando 423 sueros de cerdas procedentes de granjas libres de infección. Además, se analizó el suero de 185 cerdas pertenecientes a varias granjas afectadas por RSFP y atribuidas a la infección por *Yersinia enterocolitica* O: 9. Todos los sueros fueron también analizados mediante las pruebas oficiales de RB estándar (RBst) y FC (OIE 2012). Además, se utilizó la prueba de RB modificada (-RBm-; Blasco *et al.*, 1994) y un ELISA-i comercial "I.B. Porcine" (Ingenasa S.L).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentan en la Tabla 1. Como puede apreciarse, las pruebas usadas oficialmente mostraron una moderada (93,5%; RBst) o baja (72,2%; FC) sensibilidad para el diagnóstico de la infección. Además, ambas pruebas mostraron una baja especificidad en granjas afectadas por RSFP. Estos resultados coinciden plenamente con los descritos anteriormente (EFSA 2009), y cuestionan la estrategia diagnóstica recomendada por la UE. Por otro lado, la prueba de RBm resultó en una Se superior a la del RBst, pero también en una baja Sp (90,3%), por el elevado número de reacciones inespecíficas ocurridas en cerdos de granjas libres de brucelosis. Por el contrario, el ELISA-i I.B Porcine (que había sido previamente validado en nuestro laboratorio (Muñoz *et al.*, 2012) ofreció un 100% de Sp en granjas libres de Brucelosis y una elevada Se (95,3%) para diagnosticar la infección. Sin embargo, la especificidad relativa de todas estas técnicas en las granjas afectadas por RSFP resultó extremadamente baja (entre 30,3% y 70,8% según la prueba). En cuanto a las pruebas puestas a punto con antígeno citosólico, el ELISA-i resultó en una mediocre eficacia diagnóstica, ya que al seleccionar el punto de corte necesario para obtener 100% de Sp, la Se resultante fue muy baja (45%). La CIE también proporcionó una Se muy baja (41,4%) cuando la lectura se realizó a las 3h, si bien aumentó en la lectura realizada a las 24h, resultando en un valor similar (Se = 66.3%) al obtenido en la DG (67,5% y 68,8 %, con citosol y S-LPS, respectivamente) y en la FC. Sin embargo, la DG con S-LPS resultó poco específica en granjas con RSFP, a diferencia de la CIE y DG con antígeno citosólico, que resultaron 100% específicas frente a todos los sueros afectados por RSFP. Aunque la Se diagnóstica de estas dos últimas pruebas no puede considerarse del todo satisfactoria a nivel individual, podrían ser muy útiles a nivel de granja para interpretar las RFSP en porcino, algo que solo podía hacerse hasta ahora mediante la prueba intradérmica con brucelina (Dieste *et al.* 2011).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Blasco, J. M. *et al.*, 1994. *J Clin Microbiol.* 32: 1835-1840•Cloeckaert, A. *et al.*, 1992. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1211-1219•Dieste, L. *et al.*, 2011. *Brucellosis 2011*, International Research Conference (abstract)•EFSA 2009 1144 64-112 •Garin Bastuji, B. *et al.*, 2000. No. 38: 1-5•Godfroid, J. *et al.*, 2002. *Vet Microbiol* 90: 135-145•Monreal, D. *et al.*, 2003. *Infect. Immun.* 71: 3261-3271•Munoz, P. *et al.*, 2003. X Jornadas sobre Produccion Animal 417 - 419•Muñoz, P. M. *et al.*, 2012. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 146: 150-158•Muñoz, P. M. *et al.*, 2010. 10: •Muñoz, P. M. *et al.*, 2005. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 141-151•OIE, 2012. *Oie Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2, 7th chapter 2.8.5

•**Agradecimientos:** A los veterinarios de las explotaciones colaboradoras y a las técnicas de laboratorio Sara Serrano y María Uriarte. Experiencia financiada por INIA (RTA2011-00103) y Gobierno de Aragón (Grupo Consolidado Brucellosis y beca predoctoral de L. Dieste).

Tabla 1. Sensibilidad (Se) y Especificidad (Sp) de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucellosis porcina. Para calcular la Se y Sp se usaron, respectivamente, 169 sueros de cerdos cultivo positivo y 423 sueros de cerdos libres de Brucellosis. La Sp relativa de todas las pruebas se calculó también usando 185 sueros de granjas afectadas por RSFP. Los valores se expresan como porcentaje y sus intervalos de confianza (95%), entre paréntesis.

Prueba serológica	Se	Sp	Sp relativa (RSFP)
RBm	98,2 (96,2 - 100)	90,3 (87,5 - 93,1)	30,3 (23,6 -36,9)
RBst	93,5 (89,8 – 97,2)	99,1 (98,1 - 100)	60,0 (52,9 - 67,1)
FC	72,2 (65,4 – 78,9)	100 (99,1 - 100)	70,8 (64,3 - 77,4)
ELISA-i IB Porcine	95,9 (91,6- 98,3)	100 (99,1 - 100)	31,4 (24,7 - 38,0)
DG/S-LPS	68 (61,0 - 75,1)	100 (99,1 - 100)	93,0 (89,3 - 96,7)
DG/Citosol	67,5 (60,4 -74,5)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)
CIE 3h	42 (34,6 - 49,5)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)
24h	66,9 (59,8 -74,0)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)
ELISA-i / Citosol	45,3 (36,9 - 54,0)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)

PERFORMANCE OF SEVERAL SEROLOGICAL TESTS FOR DIAGNOSING SWINE BRUCELLOSIS

ABSTRACT: The S-LPS based serological tests (RB, FC and i-ELISA) used routinely for diagnosing swine brucellosis do not discriminate the immunological responses due to brucellosis from FPSR due to infections caused by other bacteria like *Y. enterocolitica* O:9. Gel Diffusion (GD) Counterimmunoelectrophoresis (CIE) and i-ELISA tests using an O-polysaccharide free cytosolic extract obtained from *B. abortus* manB_{core} were developed and evaluated to discriminate brucellosis from FPSR. A total of 169 sera from culture positive sows, 423 sera from brucellosis free sows and 185 sera from sows belonging to FPSR affected farms were used for evaluation. The i-ELISA with cytosolic antigen was resulting in very low diagnostic performance. By contrast, GD and CIE with the same cytosolic extract resulted in moderate diagnostic sensitivity (67.5% and 66.9% respectively) but being simultaneously 100% specific in both brucellosis free farms and farms affected by FPSR, offering then a practical alternative to the brucellin skin test to discriminate brucellosis from the FPSR at herd level.

Keywords: serodiagnosis, swine, *Brucella suis* biovar 2, brucellin.

Microbiología digestiva

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA PRODUCCIÓN DE METANO EN RUMIANTES

David R. Yáñez-Ruiz y Leticia Abecia

Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada
david.yanez@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La producción de metano en el rumen representa la principal vía metabólica de recuperación de factores de reducción para permitir el consumo de electrones generados durante la hidrólisis de carbohidratos (Morgavi et al., 2010). Esta estrategia metabólica permite al rumiante la degradación de fuentes de energía en condiciones de anaerobiosis, sin embargo, acarrea dos aspectos negativos. Por un lado, la producción de metano representa una pérdida energética de entre el 2 y el 10 % de la energía bruta de la dieta; y por otro, contribuye de manera significativa a la emisión de gases con efecto invernadero (15 % del total de emisiones antropogénica). En la última década se ha llevado a cabo un ingente esfuerzo en la comunidad científica para encontrar vías de reducción de la producción de metano empleando diversas estrategias nutricionales. Sin embargo, los resultados han sido generalmente desalentadores y algunas veces contradictorios. Parte de la falta de respuesta se debe al desconocimiento que aún tenemos de la comunidad microbiana implicada en la síntesis de metano y en concreto del dominio Arquea. Este trabajo trata de describir algunos de los aspectos novedosos que se han descrito recientemente en cuanto al grupo de las arqueas del rumen y su relación con estrategias de reducción de la producción de metano.

LA COMUNIDAD DE ARQUEAS EN EL RUMEN

Las arqueas fueron clasificados por primera vez como un super-reino separado de las bacterias en 1977 a partir de árboles filogenéticos basados en las secuencias de genes de ARN ribosómico (ARNr). Estos dos grupos fueron originalmente denominados Eubacteria y Archaeobacteria, quedando finalmente denominados como Bacteria y Archaea. Dentro del dominio Arquea, es el grupo de las euriarqueotas (filo Euryarcheota) las que se encuentran en el rumen. Estas se dividen, según Kim et al. (2011), en 4 clases principales: *Methanobacteria* (70.3% del total de secuencias analizadas), *Methanomicrobia* (16.4%), *Thermoplasmata*, (7.4%) y *Methanopyri* (0.03%). Dentro de estas 4 clases, 12 géneros son los más representativos, destacando *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanobacterium*, *Methanomicrobium* y *Methanosarcina*. Aunque, se acepta que estos géneros son los más representativos, algunos trabajos recientes que emplean técnicas secuenciación masiva (TSM), apuntan a que no en todos los casos los grupos mayoritarios han sido identificados y cultivados (Lee et al., 2012). En cualquier caso, el interés científico no está tanto en qué grupos forman parte del ecosistema, sino en qué medida contribuyen a la producción de metano y cómo responden a distintas estrategias nutricionales. Sin embargo, antes de describir la actividad de los distintos grupos, es importante resaltar cómo se establece la comunidad de arqueas en el rumen del animal.

En el rumen en desarrollo del animal pre-rumiante se puede encontrar bacterias celulolíticas y arqueas metanogénicas desde los primeros días de vida, que alcanzan abundancias muy similares a las de animales adultos en dos, tres semanas de vida. En estas primeras etapas, sin embargo, son las bacterias acetogénicas las que representan el grupo que más contribuye a la utilización de H₂. Se ha observado que a medida que el consumo de alimento sólido se incrementa, la comunidad de acetogénicas es gradualmente reemplazada por arqueas metanogénicas (Gagen et al., 2012). En este sentido, parece existir una transición en la abundancia relativa de los grupos mayoritarios de arqueas antes y después del destete, como muestran los resultados de piro-secuenciación que se presentan en la Figura 1 (Abecia et al., resultados no publicados). Esta evolución puede asociarse a los cambios que ocurren en la presión parcial de H₂ en el ecosistema, que va favoreciendo la actividad de ciertos grupos de arqueas en detrimento de otros y de bacterias acetogénicas. Trabajos recientes, apuntan a que existe una relación entre la comunidad de arqueas del rumen en el

animal pre-rumiante y en el adulto (Gagen y col., 2012) y que los acontecimientos relacionados con la colonización de arqueas del rumen que ocurren en estas primeras etapas de la vida del animal parecen tener una incidencia importante en la actividad del rumen en el animal adulto, lo que permitiría desarrollar estrategias de intervención como se describe en Abecia et al. (2013).

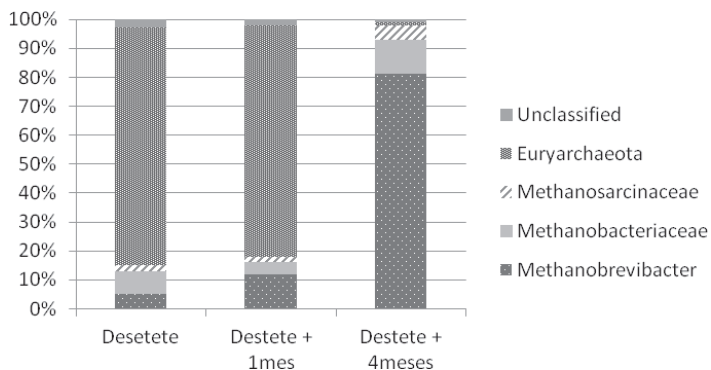


Figura 1. Abundancia relativa de los grupos mayoritarios de arqueas del rumen en cabras de distintas edades (Abecia et al., resultados no publicados).

ACTIVIDAD METANOGÉNICA DE ARQUEAS Y RESPUESTA A DISTINTAS ESTRATEGIAS NUTRICIONALES

En la última década se ha constatado que la actividad metanogénica del ecosistema ruminal no se relaciona directamente con la biomasa total de arqueas, por lo que la cuantificación de este grupo no parece aportar información relevante (Morgavi et al., 2010). Parece más interesante, sin embargo, la medición de la actividad de ciertas enzimas implicadas en la reducción de CO_2 a CH_4 , como la methyl CoM reductasa (*mcrA*), o los cambios inducidos sobre los grupos (mayoritarios y minoritarios) de arqueas. Zhou et al. (2010) han mostrado que la comunidad de arqueas del rumen de terneros con distintas eficiencias de digestión varían, de manera que *Methanospaera stadtmannae* y *Methanobrevibacter sp.* predominaban en los animales con eficiencias más bajas. Esto coincide con resultados obtenidos recientemente en nuestro grupo en el que en cabras tratadas con bromoclorometano (BCM) el grupo de Methanomicrobiales desciende drásticamente cuando se reduce la producción de metano (Abecia et al., resultados no publicados). Esta distinta sensibilidad a compuestos antimetabólicos de distintas especies de arqueas ha sido también demostrada en cultivos puros en nuestro grupo empleando BCM tal y como se ilustra en la Figura 2 para *M. ruminantium* y *M. barkeri*.

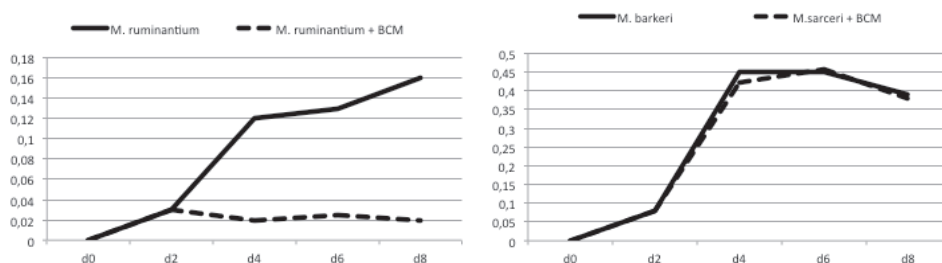


Figura 2. Evolución del crecimiento ($\text{ml CH}_4/\text{ml}$) de cultivos puros control de *Methanobrevibacter ruminantium* y de *Methanosarcina barkeri* y tratados con BCM (Abecia et al., resultados no publicados).

La variación en la abundancia de grupos de arqueas se relaciona con su capacidad para crecer a distintos niveles de presión parcial de H₂ en el rumen. Esto está ligado a la presencia y niveles de expresión de algunos de los genes que codifican las enzimas methyl CoM reductasa (*mcr I* y *II*) y N5-methyltetrahydromethanopterin (*mtr*), puesto que varían sustancialmente entre géneros y especies (Attwood y McSweeney, 2008). Los niveles de expresión de estos genes pueden ser empleados como biomarcadores de la actividad metanógena. En este sentido, recientemente Poulsen et al. (2013) han observado empleando TSM y metatranscriptómica que los niveles de expresión de las 3 subunidades de la coenzima *mcrA* se vieron afectados en vacas lecheras tratadas con aceite de colza, pero que este descenso no afectó a ninguno de los grupos mayoritarios de arqueas, sólo a las pertenecientes al grupo de Thermoplasmatales, uno de los grupos menos estudiado en el rumen.

Los estudios llevados a cabo en los últimos años en relación al ecosistema microbiano del rumen y la producción de metano, inciden en la importancia de combinar datos de expresión génica y abundancia filogenética y que en algunos casos grupos microbianos minoritarios considerados como no esenciales pueden jugar un papel más relevante de lo que inicialmente se pensaba. La distribución proporcional de grupos de arqueas con distinta capacidad para desarrollarse en condiciones de presión parcial de H₂ variables parece explicar parte del éxito de algunas estrategias nutricionales que se están desarrollando en la actualidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecia, L., Martín-García, I., Martínez, G., Newbold, C.J., Yáñez-Ruiz, DR. 2013. Journal of Animal Science (en prensa). •Attwood, G.y McSweeney, C. 2008. Australian Journal of Experimental Agriculture, 48, 28–37. •Gagen, E.J., Mosoni, P., Denman, S.E., Al Jassim, R., McSweeney, C.S., Forano, E.2012. Microbial Ecology. 64: 628-640. •Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J. 2010. Animal. 4: 1024-1036. • Poulsen, M. 2013. Nature Communications 4: 1428. • Kim, M., Morrison, M., Yu, M. 2010. FEMS Microbiology Ecology. 76: 49–63. • Lee, J. Y., Jung, Y. K. Oh, S. S. Lee, E. L. Madsen, C. O. Jeon. 2012. Applied and Environmental Microbiology. 78: 5983-93. • Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L.L. 2010. Applied and Environmental Microbiology. 76: 3776-3786.

Agradecimientos: los autores agradecen el trabajo desarrollado por Gonzalo Martínez en el procesado de datos de piro-secuenciación y de Eva Ramos-Morales y Elisabeth Jiménez en la inoculación de cultivos puros. Parte de los resultados presentados han sido financiados por los proyectos FP7-Marie Curie Reintegration Grant 224816–METANORUMENy AGL2008-04707-C02-01.

MICROBIAL ASPECTS OF METHANE PRODUCTION IN THE RUMEN

ABSTRACT: this work presents some of the recent findings on the archaeal taxonomy in the rumen, how the distribution of groups relates to methanogenesis and to what extent this is linked to the response to different anti-methanogenic strategies. The combination of gene expression and microbial taxonomy studies appears essential to identify biomarkers or key microbial groups that relate to low methane emissions.

Keywords: Archaea, rumen, methane

EFFECTO DE LA INCLUSION DE COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS EN LA DIETA SOBRE BACTERIAS DEL GRUPO BUTYRIVIBRIO EN FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO

E. Ramos-Morales, G. Martínez, L. Abecia, A.I. Martín-García, E. Molina-Alcaide, D.R. Yáñez-Ruiz.

Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada, Spain
eva.ramos@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se están desarrollando estrategias que permitan manipular la biohidrogenación de los ácidos grasos en el rumen, mediante la identificación de los microorganismos responsables del proceso, así como de compuestos que puedan alterar su actividad (Lourenço et al., 2010). El objetivo principal es reducir la formación de ácidos grasos saturados e incrementar la concentración de insaturados, particularmente *cis*-9, *trans*-11 CLA, en el rumen para su posterior absorción e incorporación a los productos derivados de los rumiantes. También se persigue el aumento de la concentración de ácido vaccénico (VA) en el rumen, puesto que éste puede actuar como sustrato para la formación de *cis*-9, *trans*-11 CLA en los tejidos. Las bacterias pertenecientes al grupo *Butyrivibrio* son las conocidas con mayor actividad en el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos en el rumen. *Butyrivibrio fibrisolvens* es capaz de hidrogenar el ácido linoleico a CLA y VA y *Butyrivibrio proteoclasticus* lo reduce a esteárico. El uso de compuestos derivados del ajo ha despertado un gran interés como alternativa al empleo de antibióticos para la manipulación de la fermentación ruminal. Estudios *in vitro* en nuestro laboratorio (Ramos-Morales et al., 2013) han mostrado que la biohidrogenación del ácido linoleico resultó afectada por compuestos de este tipo: dialil disulfuro (DDS) y propil propano tiosulfonato (PTS), dando lugar a un aumento en la acumulación de VA. El objetivo de este trabajo fue establecer si los efectos de DDS y PTS sobre la biohidrogenación ruminal podrían haber estado asociados con cambios dentro de la población del grupo *Butyrivibrio*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 fermentadores de flujo continuo simple (1 l) en dos periodos replicados de 12 días cada uno. El inóculo ruminal (700 ml/fermentador) se obtuvo de 8 cabras de raza murciano-granadina, canuladas en rumen y alimentadas a base de heno de alfalfa y concentrado (1:1). Para cada período, tres de los fermentadores se inocularon con una mezcla de contenido ruminal procedente de tres animales distintos seleccionados al azar. Los fermentadores recibían la misma dieta (16 g/fermentador/día) que los animales donadores del inóculo en dos tomas, a las 9:00 y a las 14:00 h. Además, a dos fermentadores por periodo se les adicionó 80 μ l/l o 200 μ l/l al día de DDS y PTS, respectivamente. De esta manera en los dos periodos se utilizaron 4 inóculos distintos y 4 fermentadores por tratamiento (control, PTS y DDS). Al final de cada periodo, se extrajo contenido de los vasos de fermentación a las 0, 2 y 4 h tras la alimentación y se hizo una mezcla que se conservó a -80°C, para la extracción de ADN. Se cuantificó la abundancia de bacterias totales (Maeda et al. 2003) y la abundancia relativa a bacterias totales (Δ Ct) de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Butyrivibrio proteoclasticus* mediante PCR a tiempo real (Potu et al., 2011). La biodiversidad y estructura del grupo *Butyrivibrio* se estudió mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) según describen Kim et al. (2008). El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un modelo univariante GLM del programa SPSS 19.0, considerando la mezcla del contenido ruminal inoculado a los fermentadores como covariable. Las diferencias entre medias se establecieron utilizando el test DMS ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de copias de bacterias totales presentes en los fermentadores no mostró diferencias ($P=0,941$) debidas al tratamiento con DDS y PTS (Tabla 1). Igualmente, la abundancia de *B. proteoclasticus*, expresada como proporción del total de bacterias, no se

vió afectada ($P=0,699$). Sin embargo, la abundancia de *B. fibrisolvans* resultó mayor ($P=0,009$) en las muestras procedentes de fermentadores tratados con PTS en comparación con los no tratados o tratados con DDS. Estos resultados apoyan observaciones previas acerca de que cepas aún no cultivadas del grupo *Butyrivibrio* podrían estar asociadas con la inhibición de la biohidrogenación de ácidos grasos (Kim et al., 2008). La distribución de la población de *Butyrivibrio* en el contenido del fermentador para cada tratamiento se presenta en la figura 1. El dendrograma muestra que dentro del grupo *Butyrivibrio*, las muestras se agruparon en dos clados separando a los fermentadores alimentados con la dieta control, de aquellos a los que se les adicionó DDS y PTS, con un 58% de similitud compartida. Las muestras correspondientes a los tratamientos con DDS y PTS se agruparon de manera separada, indicando un efecto diferente de esos compuestos sobre la estructura de la población de *Butyrivibrio*. Los tratamientos con PTS y DDS promovieron una mayor diversidad en el grupo *Butyrivibrio* en comparación con el control, siendo ésta mayor para el PTS que para el DDS (tabla 1). Estas diferencias podrían atribuirse a la capacidad de las bacterias del grupo *Butyrivibrio* para degradar estos compuestos, en algunos casos, o a la permeabilidad diferenciada de la membrana al paso de DDS y PTS al interior celular (Miron et al., 2000; Hart et al., 2008). La adición de DDS y PTS podría haber favorecido la proliferación de especies no identificadas dentro del grupo *Butyrivibrio* asociadas a cambios en el proceso de biohidrogenación ruminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., Newbold, C. J. 2008. Anim. Feed Sci. Technol. 147: 8-35.
- Kim, E.J., Huws, S.A., Lee, M.R.F., Wood, J.D., Muetzel, S.M., Wallace, R.J., Scollan, N.D. 2008. J. Nutr. 138:889-896.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R.J. 2010. Animal. 4:7, 1008-1023.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koikeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S. 2003. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 39: 81–86.
- Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, H., Weiner, L., 2000. Biochim. Biophys. Acta 1463, 20–30.
- Potu, R.B., AbuGhazaleh, A.A., Hastings, D., Jones, K., Ibrahim, A. 2011. J. Microbiol. 49:216-223.
- Ramos-Morales, E., Martínez, G., Abecia, L., Molina-Alcaide, E., Martín-García, A.I., Yáñez-Ruiz, D.R. 2013. AIDA. XV Jornadas sobre Producción Animal.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2008-04707-C02-01) y la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P07-RNM-02746).

Tabla 1. Efecto de dialil disulfuro (DDS) y propil propano tiosulfinato (PTS) sobre la concentración de bacterias totales (log copias/16S rRNA/g MS) y abundancia relativa a bacterias totales (ΔCt) de *B. fibrisolvans* y *B. proteoclasticus* y parámetros de diversidad del grupo *Butyrivibrio* en el contenido del vaso de fermentación de fermentadores de flujo continuo tras 12 días de incubación.

	Control	DDS	PTS	SE	P
Bacterias totales	9,74	9,71	9,76	0,094	0,941
<i>Butyrivibrio fibrisolvans</i>	13,3 ^a	13,2 ^a	16,9 ^b	0,714	0,009
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	0,896	1,214	0,868	0,313	0,699
Diversidad bacteriana					
Riqueza	22,3 ^a	27,0 ^b	31,0 ^c	0,999	0,001
Índice de Shannon	3,10 ^a	3,29 ^b	3,43 ^c	0,037	0,001
Uniformidad	0,780 ^a	0,829 ^b	0,865 ^c	0,009	0,001

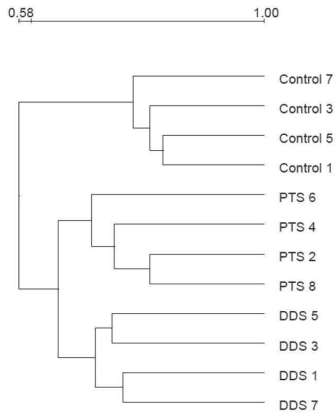


Figura 1. Dendrograma derivado del análisis de DGGE de la similitud en la población de *Butyrivibrio* en fermentadores de flujo continuo alimentados con una dieta control (sin aditivo) y tratados con dialil disulfuro (DDS) y propil propano tiosulfinato (PTS).

EFFECT OF ADDING ORGANOSULPHUR COMPOUNDS TO THE DIET ON THE BUTYRIVIBRIO COMMUNITY IN CONTINUOUS- CULTURE FERMENTERS

ABSTRACT: *In vitro* studies have shown that linoleic acid biohydrogenation was altered by diallyl disulfide (DDS) and propyl propane thiosulfinate (PTS) addition causing an increased accumulation of VA. The present study was undertaken to elucidate whether those effects could be associated to shifts within the *Butyrivibrio* population. Six single-flow continuous-culture fermenters, inoculated with rumen fluid from goats, were used in two replicated periods of 12 days each. Two fermenters per period received either a control diet (without additive) or the same diet with 80 μ l/l of DDS or 200 μ l/l of PTS daily. On day 12, samples of fermenter's content taken at 0, 2 and 4 h after feeding, were pooled and kept at -80°C for DNA extraction. Total eubacteria were quantified and the relative abundances of *B. fibrisolvans* and *B. proteoclasticus* were determined by real time PCR. Biodiversity within *Butyrivibrio* group was studied by DGGE. The addition of DDS and PTS did not affect the amount of total bacteria or relative abundance of *B. proteoclasticus*, although PTS seemed to promote higher abundance of *B. fibrisolvans* (P=0.009), in comparison to control and DDS treatments. The cluster analysis showed segregation of fermenters treated with garlic derived compounds from those of the control group and DDS and PTS treatments clustered separately. . The addition of DDS and PTS may have favored the growth of unidentified species within the *Butyrivibrio* group associated to changes in the biohydrogenation process.

Keywords: biohydrogenation, *Butyrivibrio*, organosulphur compounds

COMPARACIÓN DEL MUESTREO A TRAVÉS DE CÁNULA RUMINAL O SONDA ESOFÁGICA EN OVEJAS Y CABRAS: PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN Y MICROORGANISMOS DEL RUMEN

E. Ramos-Morales¹, A.I. Martín-García¹, E. Jiménez¹, A. Arco-Pérez¹, D.R. Yáñez-Ruiz¹, P. Frutos², G. Hervás²

¹Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada

²Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León
eva.ramos@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La canulación ruminal se considera el método de referencia para la obtención de muestras representativas de digesta del rumen sin necesidad de sacrificio y, por tanto, ha sido ampliamente utilizada en la investigación en nutrición de rumiantes. Sin embargo, otros métodos como la sonda esofágica permiten la toma de muestras de un mayor número de animales, reduciendo el coste y los problemas de bienestar asociados a la canulación. Aunque algunos autores argumentan que la toma de muestras mediante sonda esofágica puede conllevar a la contaminación con saliva (Duffield et al., 2004), otros exponen que los parámetros de fermentación ruminal determinados en muestras tomadas a través de la cánula o mediante la sonda resultaron similares (Shen et al., 2012). Este estudio se llevó a cabo con cabras y ovejas canuladas en el rumen para validar el uso de la sonda esofágica en la investigación con pequeños rumiantes. El objetivo principal de este estudio no fue la comparación directa entre métodos, sino comprobar si ambas técnicas podrían reflejar las diferencias, en cuanto a parámetros de fermentación y microbiología del rumen, debidas a la especie y a distintos momentos de muestreo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 ovejas segureñas y 4 cabras murciano-granadinas canuladas en el rumen, que se alimentaron con una dieta constituida por heno de alfalfa y concentrado (1:1). La dieta se administró en dos tomas, aproximadamente el 60% de la ración total diaria a las 9:00 h, y el 40% restante a las 16:00 h. El día 15 se tomaron muestras de digesta ruminal de cada animal, empleando sonda esofágica o a través de la cánula ruminal, antes del aporte de la ración de la mañana (Pre) y tras 4 horas (Post). Las muestras obtenidas se filtraron con una membrana de nailon de 400 μ m de tamaño de poro, se midió el pH y se analizaron sus contenidos de amoníaco y lactato, por colorimetría, y de ácidos grasos volátiles, por cromatografía de gases. Además, se cuantificaron los grupos microbianos más abundantes (bacterias, protozoos y arqueas metanogénicas), así como una bacteria fibrolítica (*Ruminococcus flavefaciens*) empleando PCR a tiempo real (Denman et al., 2007). El efecto de la especie (S) y el momento de muestreo (T) se analizaron mediante un análisis de varianza que incluía el animal como efecto aleatorio. Para ello, se utilizó el procedimiento MIXED del SAS 9.2(SAS Institute Inc., Cary, EE.UU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación a los parámetros de fermentación ruminal, las dos técnicas fueron capaces de detectar diferencias significativas entre momentos de muestreo, siendo la disminución del pH y el aumento de los ácidos grasos volátiles esperados cuando se muestrea tras la ingestión (Cantalapiedra-Hijar et al., 2009). En cambio, ninguna de ellas evidenció variaciones entre especies en la mayoría de los parámetros de fermentación, aunque las proporciones molares de acético fueron estadísticamente superiores ($P=0,029$) en las ovejas cuando se muestreó a través de la cánula, en tanto que la sonda solo detectó una tendencia ($P=0,056$). Ambos métodos, sonda esofágica y cánula ruminal, mostraron cantidades similares de bacterias totales en cabras y ovejas. Sin embargo, esta cantidad disminuyó significativamente cuando se muestreó tras la ingestión, lo cual solo fue patente en las muestras tomadas a través de la cánula ($P=0,011$) frente a las de la sonda esofágica ($P=0,509$). Esto podría ser debido al efecto de dilución que supone el consumo de la dieta

cuando la muestra de contenido ruminal se obtiene a través de la cánula, puesto que incluye tanto material líquido como sólido (Dehority, 2003). Los dos tipos de muestreo, sonda y cánula, evidenciaron diferencias significativas en la cantidad de protozoos entre especies ($P=0,002$ y $P<0,001$, para cánula y sonda, respectivamente), siendo este número mayor en cabras que en ovejas, como se ha observado en estudios anteriores (Yáñez-Ruiz et al., 2004). Igualmente, ambas técnicas reflejaron diferencias en el número de protozoos en función del momento de muestreo, siendo éste mayor ($P=0,024$ y $P<0,001$, para cánula y sonda, respectivamente) antes de la ingestión. En ningún caso se observaron variaciones en el número de arqueas metanogénicas y *R. flavefaciens*. La variación en los valores de cuantificación obtenidos por sonda es en general mayor que a través de la cánula, lo que podría explicarse por su posible menor representatividad (al recogerse una cantidad menor y de una zona más limitada) o quizás por una cierta contaminación con algo de saliva. En general, estos resultados indican que la técnica de muestreo mediante sonda esofágica permite detectar diferencias entre tratamientos (i.e., entre especies o momentos de muestreo) en los parámetros de fermentación y concentración de microorganismos del rumen, de forma similar a la técnica de la cánula ruminal. Por tanto, el empleo de sonda esofágica sería adecuado para el muestreo de digesta ruminal en pequeños rumiantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2009. J. Anim. Sci. 87: 622-631.
- Dehority B.A. 2003. Nottingham University Press (UK)
- Denman S.E., Tomkins N.W., McSweeney C.S. 2007. FEMS Microbiol Ecol. 62: 313-22.
- Duffield, T., Plaizier, J.C., Fairfield, A., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Wilson, J., Aramini, J., McBride, B. 2004. J. Dairy Sci. 87: 59-66.
- Shen, J.S., Chai, Z., Song, L.J., Liu, J.X., Wu, Y.M. 2012. J. DairySci. 95: 5978-5984.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Moumen, A., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2004. J. Anim. Sci. 82: 2023-2032.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos AGL2011-27218 y AGL2011-23700).

COMPARISON OF SAMPLING BY RUMEN CANNULA OR STOMACH TUBE IN SHEEP AND GOATS: FERMENTATION PARAMETERS AND RUMEN MICROORGANISMS

ABSTRACT: Rumen cannulation is considered the most appropriate method for representative sampling of digesta and it has been widely used in research. However, other methods such as oral stomach probing represent an alternative to allow rumen sample collection from larger populations, reducing costs and welfare issues associated to cannulated animals. This experiment was conducted with ruminally cannulated sheep and goats to validate the use of the stomach probing in small ruminant nutrition research. Four sheep and four goats were fed a diet consisting of alfalfa hay and concentrate (1:1). On day 15, samples of rumen digesta were taken by stomach tube and rumen cannula, before (Pre) and 4 hours after the morning feeding (Post) and rumen fermentation parameters (pH, lactate, ammonia, and total VFA concentrations) were measured. Additionally, the three main rumen microbial groups (bacteria, protozoa and methanogenic archaea) and fibrolytic bacteria (*Ruminococcus flavefaciens*) were quantified by real time PCR. Overall, sampling by rumen cannula or stomach tube was able to detect similar differences in fermentation parameters and numbers of microorganisms between sheep and goats sampled before and after feeding. These results suggest that stomach probing could be a suitable method for sampling rumen digesta from small ruminants.

Keywords: rumen cannula, stomach tube, goat, sheep

Tabla 1. Capacidad de las dos técnicas de muestreo, sonda esofágica (SON) y cánula ruminal (CAN), para detectar diferencias en parámetros de la fermentación ruminal debidas al momento de muestreo (pre y post administración de la dieta) y a la especie (cabra y oveja)

	Método	S		T		eed ¹	Prob. ²		
		Cabra	Oveja	Pre	Post		S	T	SxT
pH	CAN	6,67	6,42	6,93	6,16	0,139	0,183	0,000	0,991
	SON	7,02	7,04	7,31	6,75	0,121	0,883	0,002	0,732
Amoniaco(mg/L)	CAN	215,0	284,3	214,3	284,9	51,28	0,321	0,097	0,952
	SON	197,5	263,8	200,0	261,3	42,19	0,242	0,110	0,672
Lactato(mg/L)	CAN	210,4	204,3	185,8	228,9	16,79	0,766	0,019	0,095
	SON	148,5	131,5	113,3	148,5	21,28	0,559	0,006	0,063
AGV totales (mmol/L)	CAN	62,9	90,7	44,2	109,4	12,92	0,117	0,001	0,515
	SON	54,5	74,7	40,8	88,4	10,50	0,168	0,001	0,392
Acetato: propionato	CAN	4,92	5,11	5,78	4,25	0,199	0,349	<0,001	0,439
	SON	5,06	5,27	6,00	4,34	0,217	0,417	<0,001	0,485
Proporciones molares (mol/mol)									
Acético	CAN	0,672	0,691	0,677	0,687	0,75	0,029	0,225	0,128
	SON	0,680	0,697	0,684	0,693	0,80	0,056	0,269	0,145
Propiónico	CAN	0,142	0,138	0,118	0,162	0,43	0,465	<0,001	0,066
	SON	0,139	0,136	0,115	0,160	0,42	0,439	<0,001	0,071
Butírico	CAN	0,118	0,117	0,125	0,109	0,41	0,812	0,002	0,674
	SON	0,113	0,115	0,122	0,106	0,45	0,679	0,004	0,879
Otros ³	CAN	0,069	0,054	0,080	0,042	0,56	0,023	<0,001	0,005
	SON	0,068	0,053	0,080	0,041	0,54	0,018	<0,001	0,004

¹eed, error estándar de la diferencia.

²Prob., nivel de significación. S, efecto de la especie; T, efecto del momento de muestreo; SxT, efecto de la interacción especie x momento de muestreo.

³Suma de isobutírico, valérico, isovalérico y caproico.

Tabla 2. Capacidad de las dos técnicas de muestreo, sonda esofágica (SON) y cánula ruminal (CAN), para detectar diferencias en el recuento de los tres grupos microbianos mayoritarios en el rumen, así como en *R. flavefaciens*, debidas al momento de muestreo (pre y post administración de la dieta) y a la especie (cabra y oveja)

Log ₁₀ copias del gen/g MF	Método	S		T		eed ¹	Prob. ²		
		Cabra	Oveja	Pre	Post		S	T	SxT
Bacterias Totales	CAN	11,4	11,3	11,4	11,2	0,069	0,162	0,011	0,359
	SON	11,3	11,2	11,3	11,2	0,164	0,653	0,509	0,868
Protozoos	CAN	10,5	10,3	10,5	10,3	0,079	0,002	0,024	0,732
	SON	10,5	10,1	10,4	10,2	0,050	<0,001	<0,001	0,291
Metanogénicas	CAN	8,99	9,05	9,14	8,91	0,150	0,690	0,151	0,576
	SON	8,86	8,72	8,94	8,64	0,251	0,600	0,249	0,714
<i>R. flavefaciens</i>	CAN	4,47	4,81	4,82	4,46	0,331	0,324	0,300	0,811
	SON	3,91	4,33	4,26	3,97	0,637	0,201	0,286	0,336

¹eed, error estándar de la diferencia.

²Prob., nivel de significación. S, efecto de la especie; T, efecto del momento de muestreo; SxT, efecto de la interacción especie x momento de muestreo.

MODIFICACIONES TÉCNICAS EN FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO: EFECTOS SOBRE LA POBLACIÓN DE PROTOZOOS Y LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Cabeza-Luna I¹., Carro M.D²., Muñoz-Martínez A¹., Molina-Alcaide E¹.

¹Estación Experimental del Zaidin (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada

²Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria. 28040 Madrid

molina@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Los sistemas in vitro de simulación de la fermentación ruminal constituyen herramientas muy útiles para el estudio de la función ruminal. El mantenimiento de poblaciones microbianas representativas de las existentes en el rumen de los animales es uno de los requisitos que deberían cumplir los sistemas in vitro, pero la disminución del número de protozoos en los fermentadores es un hecho bien constatado (Moumen et al., 2009; Martínez et al., 2011). Dado el importante papel que los protozoos desempeñan en la función ruminal, el diseño de modificaciones técnicas que permitan mantener estas poblaciones en fermentadores supondría un importante avance para su utilización en el estudio del ecosistema ruminal. El objetivo del presente trabajo fue analizar dos modificaciones técnicas para mejorar la retención de los protozoos en fermentadores de flujo continuo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo 2 series de incubación de 14 días de duración cada una con 6 fermentadores de flujo continuo. En cada serie de incubación se asignaron al azar dos fermentadores a cada uno de los tratamientos experimentales: CON (control; sin modificaciones), ES (esponja situada en la salida del efluente de los fermentadores) y FIL (filtro formado por dos capas de nylon de 50 µm de tamaño de poro y situado en la salida del efluente). Se utilizaron cuatro ovejas fistuladas en el rumen como donantes de inóculo ruminal. Los animales recibieron una dieta constituida por heno de alfalfa y concentrado en proporción 50:50, administrada una vez al día. Tras 10 días de adaptación a la dieta se tomó contenido ruminal de las ovejas en ayunas, se mezcló, se filtró a través de 4 capas de gasa y se introdujeron 700 ml del filtrado en cada uno de los fermentadores. El flujo de saliva fue de 40 ml/h y se mantuvo constante el flujo de CO₂. Cada fermentador recibió diariamente 30 g la misma dieta que recibían las ovejas. El pH del contenido de los fermentadores se midió dos veces al día, durante todos los días de incubación. Los días 2, 6, 10 y 14 de cada serie de incubación se tomaron muestras de los efluentes para analizar las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco. Adicionalmente, se tomaron muestras (10 ml) del contenido de los fermentadores, que se diluyeron en 10 ml de formaldehído para el recuento de protozoos. A una alícuota de 1 ml de la disolución anterior se añadieron 5 µl de una solución de verde malaquita, se dejó reposar la mezcla durante 12 horas y se añadió 1 ml de glicerol como fijador. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su recuento. El recuento se realizó por visualización directa en microscopio óptico y se diferenció entre protozoos entodiniomorfos y holotricos (Dehority, 1993). Se hizo el conteo de cada muestra por duplicado y si la variabilidad era mayor del 10% se realizaba otro recuento. Los datos se analizaron mediante ANOVA (PROC MIXED del paquete estadístico SAS) utilizando un modelo de medidas repetidas en el tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento experimental no afectó ($P > 0,10$) al número de protozoos, a las concentraciones de amoníaco y de ácidos grasos volátiles (AGV) ni a la relación acético/propiónico (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución durante el período de incubación de la población de protozoos y de la concentración de amoníaco y ácidos grasos volátiles (AGV) en fermentadores de flujo continuo sin modificaciones técnicas (CON) y provistos de una esponja (ES) y de un sistema de filtros (FIL)

	TR	Tiempo (T; días)				Probabilidad (P =)			
		2	6	10	14	eem	TR	T	TRxT
Protozoos ($\times 10^3/\text{ml}$)									
Total	CON	62,9 ^b	22,2 ^a	13,2 ^a	9,3 ^a	7,17	0,83	<0,001	0,93
	ES	64,3 ^b	19,2 ^a	16,6 ^a	15,5 ^a				
	FIL	58,2 ^b	20,4 ^a	17,3 ^a	19,5 ^a				
Entodiniomorfos	CON	56,4 ^b	18,9 ^a	11,6 ^a	8,5 ^a	6,67	0,82	<0,001	0,96
	ES	49,8 ^b	17,1 ^a	14,6 ^a	14,8 ^a				
	FIL	53,1 ^b	18,4 ^a	15,6 ^a	18,0 ^a				
Holotricos	CON	6,50 ^b	3,30 ^a	1,67 ^a	0,85 ^a	1,58	0,21	<0,001	0,41
	ES	4,50 ^b	2,10 ^a	1,98 ^a	0,70 ^a				
	FIL	5,08 ^b	2,00 ^a	1,65 ^a	1,50 ^a				
pH	CON	6,49 ^b	6,14 ^a	6,10 ^a	6,08 ^a	0,037	0,56	<0,001	0,61
	ES	6,53 ^c	6,27 ^b	6,11 ^a	6,12 ^a				
	FIL	6,54 ^b	6,25 ^a	6,16 ^a	6,20 ^a				
Amoníaco (mg/100 ml)	CON	42,0 ^c	36,8 ^b	32,0 ^a	29,0 ^a	1,65	0,19	<0,001	0,54
	ES	42,4 ^c	31,2 ^b	26,2 ^a	26,7 ^a				
	FIL	40,1 ^c	32,7 ^b	27,4 ^a	26,9 ^a				
Total AGV (mmol/l)	CON	53,7 ^a	72,3 ^b	77,7 ^b	73,0 ^b	2,71	0,52	<0,001	0,79
	ES	53,8 ^a	73,7 ^b	75,0 ^b	72,1 ^b				
	FIL	50,6 ^a	72,0 ^b	68,8 ^b	71,2 ^b				
Acético (mol/100 mol)	CON	60,7 ^b	55,0 ^a	54,4 ^a	55,1 ^a	0,69	0,24	<0,001	0,55
	ES	60,5 ^b	56,1 ^a	56,0 ^a	56,7 ^a				
	FIL	61,3 ^b	54,6 ^a	56,0 ^a	56,2 ^a				
Propiónico (mol/100 mol)	CON	18,9 ^a	22,9 ^b	23,5 ^b	23,4 ^b	0,43	0,97	<0,001	0,96
	ES	18,9 ^a	22,5 ^b	23,3 ^b	23,3 ^b				
	FIL	18,8 ^a	23,2 ^b	23,0 ^b	23,4 ^b				
Butírico (mol/100 mol)	CON	13,8 ^a	15,2 ^b	14,7 ^b	14,6 ^{ab}	0,31	0,45	<0,001	0,54
	ES	13,7	14,1	13,8	13,6				
	FIL	13,6 ^a	15,1 ^b	14,3 ^{ab}	14,0 ^a				
Otros AGV (mol/100 mol)	CON	6,7 ^a	6,9 ^{ab}	7,4 ^b	6,9 ^{ab}	0,22	0,10	0,019	0,22
	ES	6,9	7,3	6,9	6,5				
	FIL	6,3 ^a	7,1 ^b	6,7 ^{ab}	6,4 ^a				
Ac/Pr (mol/mol)	CON	3,24 ^b	2,41 ^a	2,32 ^a	2,31 ^a	0,077	0,54	<0,001	0,86
	ES	3,23 ^b	2,49 ^a	2,42 ^a	2,46 ^a				
	FIL	3,29 ^b	2,36 ^a	2,44 ^a	2,42 ^a				

¹ error estándar de la media

a, b, c en la misma fila, los valores con diferente letra difieren ($P < 0,05$)

Tanto los protozoos entodiniomorfos como los holotricos disminuyeron ($P < 0,05$) a partir del día 2 de incubación, al igual que ocurrió con el pH, las concentraciones de amoníaco, acético y butírico y la relación acético/propionico. Por el contrario, las concentraciones de AGV totales y de propiónico aumentaron a partir del día 2 de muestreo, pero se mantuvieron sin variaciones ($P > 0,10$) a partir del día 6 de incubación hasta el final del experimento. No se observaron interacciones tratamiento x tiempo de muestreo ($P = 0,22$ a $0,96$) en ningún parámetro. El descenso de los protozoos en los primeros días de incubación en fermentadores de flujo continuo se observó también en un trabajo previo de nuestro grupo en el que los fermentadores se alimentaron con dietas basadas en heno de alfalfa (Moumen et al., 2009). Karnati et al. (2009) utilizaron un sistema de filtros en fermentadores de flujo continuo, que recibían una dieta 70:30 forraje:concentrado, y lograron mantener concentraciones de protozoos ($17\text{--}22 \times 10^3/\text{mL}$) similares a las observadas en el presente estudio. Si bien las diferencias en el número de protozoos entre tratamientos experimentales no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$), hay que señalar que el último día de muestreo la concentración de protozoos en los fermentadores con esponja y con filtros fue 1,7 y 2,1 veces mayor, respectivamente, que en los fermentadores sin modificaciones técnicas, si bien las concentraciones fueron menores que las observadas en ovejas que recibían dietas similares (Martínez et al., 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dehority, B.A. 1993. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Karnati, S.K.R, Z. Yu, J.L. Firkins. 2009. J. Dairy. Sci.92: 3861-3873.
- Moumen, A., D.R. Yáñez-Ruiz, M.D. Carro, y E. Molina-Alcaide. 2009. Options Méditerranéennes, Serie A, 85: 303-306.
- Martínez, M.E., M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido, M.D. Carro. 2011. Options Méditerranéennes, Serie A 99: 97-102.
- Martínez, M.E., M.J. Ranilla, M.L. Tejido, C. Saro, M.D. Carro. 2010. J. Dairy. Sci.93: 3699-3712.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL2011-22628 financiado por el MICINN. Se agradece el apoyo técnico de Dña. Julia Fernández Yepes.

TECHNICAL MODIFICATIONS IN CONTINUOUS CULTURE FERMENTERS: EFFECTS ON PROTOZOA POPULATIONS AND FERMENTATION

ABSTRACT. The objective of this work was to study the effect of technical modifications (sponge and filters) in continuous-culture fermenters on the number of protozoa and ruminal fermentation parameters. The effect of the fermentation time was studied as well. Six fermenters fed a 50:50 alfalfa hay:concentrate diet, inoculated with rumen liquor from sheep fed the same diet, were used in two incubation runs of 14 days each. Protozoa numbers of both Entodinia and Holotricha genera and concentrations of VFA and ammonia were determined on days 2, 6, 10 and 14 after inoculation. No effects ($P > 0,10$) of technical modifications were observed either in protozoa numbers or fermentation parameters, although on day 14 protozoa numbers in fermenters provided with sponge and filters were 1.7 and 2.1 times, respectively, higher than those in control fermenters. On the contrary, incubation time affected ($P < 0,001$) all the studied parameters. No treatment x sampling time interaction ($P = 0,22$ to $0,96$) was observed. It is concluded that technical modifications used in this study do not allow for protozoa population maintenance in continuous-culture fermenters.

Keywords: continuous-culture fermenters, protozoa, ruminal fermentation, technical modifications

EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS RUMINALES Y LOS PARÁMETROS FERMENTATIVOS EN FERMENTADORES RUSITEC

Mateos, I.^{1*}, M.J. Ranilla^{1,2}, C. Saro¹, A. Díaz¹ y M.D. Carro³

¹ Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León, España

² IGM (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España

³ Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España

* imata@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Los fermentadores Rusitec (Czerkawski y Breckenridge, 1977) son uno de los tipos de fermentadores más ampliamente utilizados para simular *in vitro* la fermentación ruminal y permiten realizar estudios de larga duración (semanas). Sin embargo, debido a la prolongada extensión en el tiempo de este tipo de estudios se producen cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones de microorganismos. Existen algunos estudios que han puesto de manifiesto la disminución de la población de protozoos a lo largo del período de incubación (Carro *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2011), pero no existe información sobre otras poblaciones microbianas, a pesar de que uno de los requisitos que deberían cumplir los sistemas *in vitro* es mantener poblaciones microbianas representativas de las existentes en el rumen de los animales. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la evolución en el tiempo de la abundancia de bacterias, hongos, protozoos y arqueas, así como de los parámetros ruminales en fermentadores Rusitec.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un experimento utilizando 4 fermentadores Rusitec, durante 16 días. Se utilizó una dieta representativa de las formuladas para ganado ovino lechero con un 50% de heno de alfalfa y un 50% de un concentrado para ovejas de leche (a base de cebada, maíz, harina de soja, altramuces, avena, soja, melaza de caña y harinillas de trigo). El día 1 del experimento se inocularon los fermentadores con líquido ruminal procedente de cuatro ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con la misma dieta. Cada fermentador recibió diariamente 30 g de materia seca (MS) de dieta administrados a las 9:00 h. El forraje y el concentrado se introdujeron por separado en dos bolsas de nailon y permanecieron dentro de los fermentadores durante 48 y 24 h, respectivamente. Se realizaron muestreos del líquido de las vasijas y del efluente los días 3, 8 y 14. Además, los días 8 y 14 en cada fermentador se determinaron la producción de metano y la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y de la fibra neutro detergente (DFND).

En las muestras de efluente se analizó la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco. Las muestras del contenido de las vasijas (4 mL), se centrifugaron (19200 x g; 10 min) y se descartó el sobrenadante para obtener pellets que se congelaron y liofilizaron. Los pellets se mezclaron con un buffer de lisis y se trataron durante 3 minutos en un Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, EEUU) para provocar la lisis de los microorganismos ruminales. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit QIAamp DNA stool (QIAgen, Valencia, CA, EEUU) y siguiendo el procedimiento descrito por Yu y Morrison (2004), pero incluyó un paso adicional en el que las muestras se trataron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar inhibidores de la PCR. La cuantificación absoluta del ADN de bacterias y protozoos y relativa de arqueas y hongos se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR). Cada mezcla de PCR (20 µL) contenía: 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 0,9 µL de cada primer (20 µM) y 2 µL de muestra de ADN. Las muestras se analizaron en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) utilizando primers previamente validados para el ADN de bacterias y hongos (Denman y McSweeney, 2006), protozoos (Sylvester *et al.*, 2004) y arqueas (Denman *et al.*, 2007). Como estándar para la cuantificación absoluta de bacterias y protozoos se utilizó ADN extraído de pellets de bacterias asociadas a la fase líquida y de protozoos, respectivamente, que se aislaron del rumen de las ovejas experimentales (Saro *et al.*, 2012). Los valores

obtenidos se analizaron con el software StepOne versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y los datos de arqueas y hongos se expresaron en relación a la cuantificación absoluta de bacterias según los cálculos descritos por Pfaffl (2001). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) La significación estadística se estableció en $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Tabla 1, existieron variaciones a lo largo del tiempo de incubación en la abundancia de las cuatro poblaciones microbianas analizadas, pero en diferente sentido. La concentración de ADN bacteriano aumentó a medida que transcurrió el estudio ($P=0,003$), mientras que la concentración de ADN protozoario y la abundancia relativa de hongos y arqueas respecto a la cuantificación absoluta de bacterias disminuyeron a lo largo del tiempo ($P=0,003$, $P < 0,001$ y $P < 0,001$, respectivamente).

Ziemer *et al.* (2000) observaron que tras 10 días de incubación en fermentadores de flujo continuo, la concentración de ARN de bacterias y arqueas aumentó en comparación con la del fluido ruminal utilizado para inocularlos, mientras que la concentración de ARN de protozoos disminuyó drásticamente, lo que concuerda parcialmente con nuestros resultados. En nuestro caso la abundancia de ADN bacteriano fue mayor al cabo de 14 días de incubación que al inicio de la misma (3 días), mientras que disminuyeron la abundancia absoluta de ADN protozoario y la abundancia relativa de arqueas. Sin embargo, los dos estudios fueron realizados con diferentes sistemas de simulación de la fermentación ruminal (flujo semicontinuo vs. flujo continuo) y con inóculo procedente de diferentes especies (ovino vs. vacuno) por lo que no son directamente comparables. En un estudio realizado con fermentadores Rusitec e inóculo procedente de ovino, Martínez *et al.* (2011) observaron que el número de protozoos, cuantificado por recuento al microscopio, disminuía rápidamente en los primeros días de incubación, aunque las poblaciones de protozoos se mantenían presentes durante los 14 días que duraba el experimento.

Respecto a los resultados obtenidos de los parámetros indicadores de la fermentación ruminal, no se observaron diferencias entre tiempos de muestreo en la producción de amoníaco ($P=0,223$), de AGV totales ($P=0,121$) y de metano ($P=0,795$) ni en la DFND ($P=0,291$), pero existió una tendencia a disminuir la DMO ($P=0,066$). Sin embargo, sí se modificó el patrón de producción de AGV, ya que aumentó la proporción molar de butírico ($P=0,025$) y otros AGV ($P < 0,001$) y se redujo la de propiónico ($P < 0,001$). La no existencia de cambios significativos en la digestibilidad y producción total de AGV puede ser debida a que la actividad llevada a cabo por protozoos, hongos y arqueas fuera sustituida por las bacterias a medida que avanzó el experimento. A la vista de los resultados obtenidos y bajo las condiciones en las que se ha realizado este estudio, podemos concluir que en fermentadores Rusitec la abundancia absoluta de bacterias aumenta con el paso del tiempo y disminuye la abundancia absoluta de protozoos y la abundancia relativa de hongos y arqueas. Sin embargo, no se producen cambios en los principales parámetros de la fermentación entre los días 8 y 14 de incubación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Carro, M.D., Lebzien, P., y Rohr, K. 1995. Small Rum. Res. 15: 113-119.
- Czerkawski, J. W., y G. Breckenridge. 1977. Br. J. Nutr. 38: 371-378.
- Denman, S. E., y C. S. McSweeney. 2006. FEMS Microbiol. Ecol. 58: 572-582.
- Denman, S. E., N. Tomkins, y C. S. McSweeney. 2007. FEMS Microbiol. Ecol. 62: 313-322.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L. y Carro, M.D. 2011. Options Méditerranéennes A, 99: 97-102.
- Pfaffl, M. W. 2001. Nucleic Acids Research. 29(9): e45-e45.
- Saro, C., M. J. Ranilla, y M. D. Carro. 2012. J. Dairy Sci. 90: 5659-5668.
- Sylvester, J., S. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, y J. Firkins. 2004. J. Nutr. 134: 3378-3384.
- Yu, Z., y M. Morrison. 2004. BioTechniques. 36: 808-812.
- Ziemer, C. J., R. Sharp, M. D. Stern, M. A. Cotta, T. R. Whitehead, y D. A. Stahl. 2000. Environ. Microbiol. 2: 632-643.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL2011-22628 financiado por el MICINN.

Tabla 1: Evolución durante el período de incubación de las poblaciones microbianas, parámetros fermentativos y digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y de la fibra neutro detergente (DFND) de la dieta en fermentadores Rusitec

	Día de incubación			eem ¹	P
	3	8	14		
Microorganismos ²					
Bacterias totales	16,5 ^a	21,2 ^b	25,5 ^c	0,73	0,003
Protozoos	82,9 ^a	27,4 ^b	14,6 ^b	6,01	0,003
Hongos	4,50 ^a	0,30 ^b	0,14 ^b	0,151	<0,001
Arqueas	4,50 ^a	1,02 ^b	0,74 ^b	0,170	<0,001
Parámetros fermentativos					
Amoniaco (mg/d)	227	236	210	8,9	0,223
Total AGV (mmol/d)	111	116	106	2.6	0,121
Proporción molar (mmol/mmol)					
Acético	56,0	55,5	54,0	0,48	0,086
Propiónico	22,2 ^a	16,6 ^b	15,2 ^b	0,35	<0,001
Butírico	15,2 ^a	16,0 ^{a,b}	17,4 ^b	0,34	0,025
Otros AGV ³	6,67 ^a	12,0 ^b	13,5 ^c	0,29	<0,001
Metano (mmol/d)	-	29,8	29,6	0,36	0,795
DMO (%)	-	63,3	61,5	0,34	0,066
DFND (%)	-	46,7	47,5	0,39	0,291

¹ Error estándar de la media

² Los valores de bacterias totales y protozoos se expresan en μg de ADN/mL y los de hongos y arqueas se expresan como ADN relativo al total de ADN bacteriano

³ Suma de los ácidos isobutírico, isovalérico, valérico y caproico

^{a, b, c} en la misma fila, los valores con diferente letra difieren ($P < 0,05$)

TIME EVOLUTION OF THE ABUNDANCE OF RUMINAL MICROBIAL POPULATIONS AND FERMENTATION PARAMETERS IN RUSITEC FERMENTERS

ABSTRACT: Four Rusitec fermenters fed with a dairy sheep diet were used to assess the evolution of ruminal populations. Bacterial and protozoal absolute abundance and arqueal and fungal relative abundance were determined by qPCR and the main ruminal parameters were analyzed. Bacterial DNA concentrations increased ($P=0.025$) with time over the experiment, but protozoal DNA concentrations and relative abundance of arqueal and fungal DNA decreased ($P=0.003$, $P<0.001$ and $P<0.001$, respectively). There were no changes either in the daily production of ammonia ($P=0.223$), total volatile fatty acids (VFA; $P=0.121$) and methane ($P=0.795$) or the digestibility of organic matter ($P=0.066$) and neutral detergent fibre ($P=0.291$). Molar proportions of propionate decreased ($P<0.001$) and those of butyrate and minor VFA increased ($P=0.025$ and <0.001 , respectively) with incubation time. The results indicate that, despite of the changes in the microbial populations in the liquid phase of the digesta, most fermentation parameters were not affected.

Keywords: Rusitec fermenters, microbial populations, ruminal fermentation, qPCR

EFFECTO DEL TIPO Y FORMA DE PRESENTACIÓN DEL CEREAL DEL CONCENTRADO SOBRE LA MICROBIOTA RUMINAL EN TERNEROS EN CEBO INTENSIVO

Gimeno, A., Al-Alami, A., Abecia, L.¹, Yáñez-Ruiz, D.R.¹, Castrillo, C., Fondevila, M.

Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón, Depto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza.

¹Instituto de Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada.
mfonde@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Las dietas concentradas usadas en el cebo intensivo de terneros en el área Mediterránea pueden provocar la aparición de cuadros de acidosis debido a la fermentación masiva de los carbohidratos en rumen. En este contexto, dentro del complejo ecosistema ruminal, cobran especial importancia las especies bacterianas relacionadas con el metabolismo del lactato, tanto productoras (*Streptococcus bovis*) como utilizadoras (*Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*). Algunas de las estrategias estudiadas para la prevención de esta enfermedad se basan en el manejo de la alimentación, entre las que destaca una correcta elección de los cereales (en función del ritmo de degradación del almidón) y de la forma de presentación del concentrado. El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto del tipo de cereal, de moderado (maíz) o rápido (cebada) ritmo de fermentación, y de su forma de presentación (molido o aplastado) sobre la microbiota ruminal en terneros en cebo intensivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ocho terneros machos de raza Frisona provistos de una cánula ruminal de 1 cm de diámetro interno, con un peso vivo inicial de $154 \pm 2,0$ kg, previamente adaptados a una dieta rica en concentrado, que fueron alojados en jaulas individuales. Se formularon dos concentrados con un 60 % de cereales y distintas proporciones de maíz y cebada (75:25 - M -y 25:75 - C), que fueron ofrecidas en dos formas de presentación del cereal; molido a 3,5 mm (m) o aplastado en seco (a). El concentrado se administró *ad libitum*, en una única distribución diaria, y los animales dispusieron además de paja de cebada a voluntad. Cuatro animales fueron asignados a cada una de las dietas (M o C) durante todo el experimento. Se plantearon dos periodos experimentales de 35 d, en cada uno de los cuales el concentrado se administró en una u otra forma de presentación, siguiendo un diseño en "change-over". El último día del periodo experimental se tomaron muestras de líquido ruminal justo antes de la distribución del concentrado (8:00) y 4 y 8 h después, utilizando una sonda de 0,6 cm de diámetro interno, las cuales fueron filtradas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. Después de extraer su ADN mediante el kit QIAamp DNA (QIAGEN, West Sussex, UK), se determinó la concentración de bacterias y protozoos totales mediante PCR a tiempo real (qPCR), a partir del número de copias del gen 16S o 18S del ADNr, respectivamente, con cebadores específicos de bacterias (Maeda *et al.*, 2003) y protozoos (Sylvester *et al.*, 2004). Las concentraciones se expresan en forma logarítmica, por gramo de materia fresca. Además, se procedió a la cuantificación relativa de las poblaciones de *S. bovis*, *M. elsdenii* y *S. ruminantium* (Stevenson y Weimer, 2007), *Prevotella ruminicola* (Tajima *et al.*, 2001) y

Butyrivibrio fibrisolvens (Gudla *et al.*, 2012), de acuerdo con el método propuesto por Denman y McSweeney (2005). Los resultados fueron analizados estadísticamente por el procedimiento MIXED (SAS, versión 9.2), considerando factorializados los efectos tipo de cereal y forma de presentación, al animal dentro de cereal como unidad experimental, y la hora de muestreo como medida repetida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los recuentos de bacterias y protozoos totales no se vieron afectados significativamente por las dietas experimentales, presentando valores medios diarios de 9,97 y 4,30 copias del gen 16S y 18S, respectivamente, por gramo de materia fresca. La concentración resultante de bacterias totales se encuentra en el rango de las obtenidas por Chen *et al.* (2012), mientras que las menores concentraciones de protozoos obtenidas concuerdan con las descritas por Nagaraja *et al.* (1992), aunque en su caso fueron determinadas por microscopía óptica. La contribución relativa de las cinco especies bacterianas estudiadas (Tabla 1) supuso, en términos medios, menos del 10% del total. El tipo de cereal no tuvo efectos significativos sobre la proporción de ninguna especie, mientras que la forma de presentación del concentrado afectó a la proporción de *S. ruminantium*, superior en las dietas aplastadas que en las molidas (2,15 vs. 1,16 % del total, $P=0,012$), siendo las diferencias más marcadas con la dieta rica en maíz. Por otra parte, la hora de muestreo tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de *M. elsdenii* y *S. ruminantium*, ya que mientras la primera especie tendió a aumentar entre las 0 y las 4 h ($P=0,05$), la segunda mostró una disminución de su proporción ($P=0,002$). Las dietas aplastadas promovieron una pauta de ingestión más homogénea a lo largo del día y posiblemente un menor ritmo de fermentación del almidón de los cereales, lo que se tradujo en una fermentación ruminal más estable caracterizada por valores de pH superiores, sobre todo en el caso del maíz. Además, estas dietas promovieron una menor proporción de valores de pH inferiores a 5,6, los cuales fueron más abundantes a las 4 y 8 h tras la distribución del concentrado (Gimeno *et al.*, 2011). Este hecho, junto con la menor tolerancia de *S. ruminantium* a condiciones ácidas respecto a las productoras de lactato (Nagaraja y Titgemeyer, 2007), podría explicar su menor concentración en las dietas molidas. La disminución de su concentración durante el primer intervalo también podría deberse a esta razón, ya que durante las primeras 4 h se produjo una caída del pH en todos los tratamientos, alcanzándose los valores más bajos de pH, en concordancia con un mayor ritmo de ingestión de concentrado durante las primeras horas (Gimeno *et al.*, 2011). Por el contrario, la mayor tolerancia de *M. elsdenii* a la acidez (Therion *et al.*, 1982) podría explicar el aumento de su proporción sobre el total de bacterias durante este primer intervalo. El resto de especies estudiadas no se vieron afectadas ni por la dieta ni por la hora de muestreo. La baja proporción encontrada de *S. bovis* (en torno a un 0,001% del total), sugiere que otros microorganismos podrían estar implicados en el desarrollo de la acidosis subaguda en animales adaptados a una dieta rica en concentrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen, Y. H., M. Oba, & L. L. Guan. 2012. *Vet. Microbiol.* 159:451-459.
- Denman, S. E. & C. S. McSweeney. 2005. In 'Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants' (Ed. H. Makkar and C. S. McSweeney).
- Gimeno, A., Al Alami, A., Fondevila, M., de Vega, A., Latorre, M.A., Rodríguez, N., Schauf, S. & Castrillo, C. 2011. In 15th Congress European Society of Veterinary and Comparative Nutrition. Zaragoza.
- Gudla, P., A. A. AbuGhazaleh, A. Ishlak, &

K. Jones. 2012. Anim. Feed Sci. Tech. 171:108-116. • Maeda, H. et al. 2003. FEMS Immunol. Med. Mic. 39:81-86. • Nagaraja, T. G., & E. C. Titgemeyer. 2007. J. Dairy Sci. 90 Suppl 1:E17-38. • Nagaraja, T. G., G. Towne, & A. A. Beharka. 1992. Appl. Environ. Microb. 58:2410-2414. • Stevenson, D. M., & P. J. Weimer. 2007. Appl. Microb. Biotech. 75:165-174. • Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. T. Yu, M. Morrison, & J. L. Firkins. 2004. J. Nutr. 134:3378-3384. • Tajima, K. et al. 2001. Appl. Environ. Microb. 67:2766-2774. • Therion, J. J., A. Kistner, & J. H. Kornelius. 1982. Appl. Environ. Microb. 44:428-434.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2009-12026). A. Gimeno disfrutó de una beca FPI BES-2010-039495.

Tabla 1. Efecto de la dieta (Mm, maíz molido; Ma, maíz aplastado; Cm, cebada molida; Ca, cebada aplastada) y de la hora de muestreo sobre las proporciones de *S. ruminantium*, *M. elsdenii* y *S. bovis* (% sobre bacterias totales).

Hora	<i>S. ruminantium</i>				<i>M. elsdenii</i>				<i>S. bovis</i>			
	Mm	Ma	Cm	Ca	Mm	Ma	Cm	Ca	Mm	Ma	Cm	Ca
0	1,13	3,55	1,78	1,91	0,03	0,04	0,13	0,06	0,0014	0,0009	0,0018	0,0013
4	1,12	2,64	0,91	1,16	0,04	0,05	0,17	0,10	0,0013	0,0009	0,0010	0,0006
8	1,11	2,23	0,92	1,39	0,03	0,06	0,16	0,10	0,0009	0,0008	0,0016	0,0013
eem ¹	0,311				0,049				0,0003			
eem ²	0,193				0,027				0,0002			
probab.	C	P	C*P	H	C	P	C*P	H	C	P	C*P	H
	0,086	0,012	0,056	0,002	0,141	0,628	0,433	0,050	0,468	0,264	0,941	0,146

eem¹: Error estándar de la media para la comparación entre tratamientos (n=12).

eem²: Error estándar de la media para la comparación entre horas (n=16).

Probabilidad: C: efecto tipo cereal; P: efecto tipo de presentación; H: tiempo de muestreo

EFFECT OF TYPE AND PHYSICAL FORM OF THE CEREAL OF THE CONCENTRATE ON RUMEN MICROBIOTA IN INTENSIVELY REARED STEERS

ABSTRACT: Ruminal acidosis is a common metabolic disorder found in feedlot cattle. The aim of this work was to study the effect of the source of cereal (maize or barley) in the concentrate and its physical form (ground to 3,5 mm or dry rolled) on rumen microbiota in intensively reared steers previously adapted to a high-concentrate diet, using quantitative PCR. Total rumen bacteria and protozoa were not affected by the cereal type, nor by its presentation form. During the first 4 h after feeding, mean proportions of *Selenomonas ruminantium* decreased in all diets and those of *Megasphaera elsdenii* increased. At all sampling times, rolled diets tended to promote higher mean proportions of *S. ruminantium* than those ground. *S. ruminantium* is not as acid tolerant as other species, which could explain these results, because ground diets tended to promote lower pH values at all sampling times. The populations of *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola* were not affected by the experimental diets. The low proportions of *Streptococcus bovis* observed (about 0,001% of total bacteria) suggest that other microorganisms might also be involved in ruminal acidosis development in steers well adapted to high-grain diets.

Keywords: rumen acidosis, qPCR, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PIROSECUENCIACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RUMEN EN OVEJAS ALIMENTADAS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON MICROALGAS MARINAS

Castro-Carrera^{1,2}, T., Toral¹, P. G., Hervás¹, G., McEwan², N. R., Abecia³, L., Frutos¹, P., Girdwood², S. E., Worgan², H. J. y Belenguer^{1*}, A.

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España

²IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth SY23 3DA, Reino Unido

³Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1. 18008 Granada, España

*Correo electrónico: a.belenguer@csic.es

INTRODUCCIÓN

Se sabe que la adición a la dieta de fuentes lipídicas de origen marino, como las microalgas, altera la microbiota ruminal (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012) y en consecuencia el metabolismo de los ácidos grasos insaturados (AGI) en el rumen. Las bacterias son los principales microorganismos responsables de la biohidrogenación ruminal (Lourenço et al., 2010) pero, aunque existen diversos trabajos basados en la aplicación de técnicas moleculares (mediante el análisis del gen del ARNr 16S), persiste un gran desconocimiento sobre los microorganismos concretos implicados en dicho proceso (Huws et al., 2011). Esto es especialmente acusado en ovino, donde hay pocos estudios (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012) y no se ha empleado una técnica de secuenciación de ADN de alto rendimiento, como la pirosecuenciación (Dowd et al., 2008).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar, mediante análisis de secuenciación masiva (pirosecuenciación), el efecto de la inclusión de microalgas marinas en la dieta sobre la comunidad bacteriana del rumen en ovejas lecheras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este experimento se utilizaron 11 ovejas adultas de raza assaf en lactación, que fueron distribuidas en dos grupos (de 6 y 5 animales), y asignadas a 2 tratamientos experimentales (dietas). Todas las ovejas recibieron ad libitum una dieta mixta completa (relación forraje:concentrado 40:60) que contenía 25 g de aceite de girasol/kg MS y que estaba suplementada con 0 (control, C) o con 8 (MA) g de microalgas marinas (MA; Market Biosciences Corp., EE. UU.)/kg MS. Tras un periodo de adaptación de 20 días, los animales del grupo control continuaron con la misma dieta (C) durante los siguientes 54 días, mientras que al resto se les ofertó la dieta MA. Al final del experimento, tras el sacrificio de las ovejas, se tomaron muestras de la digesta ruminal, que se almacenaron a -80°C y posteriormente fueron liofilizadas.

El ADN microbiano se extrajo siguiendo el método descrito por Yu y Morrison (2004), con la modificación de una mayor temperatura (95°C) en la lisis celular. A partir de cada muestra de ADN genómico se amplificó un fragmento del gen del ARNr 16S bacteriano mediante PCR, utilizando cebadores bacterianos universales (27f y 357r) etiquetados con identificadores "multiplex". Los amplicones fueron normalizados, mezclados y secuenciados en un pirosecuenciador Roche 454 GS FLX Titanium (Roche, Brandford, EE. UU.), analizándose las secuencias mediante el programa informático QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology; Caporaso et al., 2010). Las unidades taxonómicas operacionales (OTU) fueron asignadas al 97% de similitud. La matriz de proporciones de las OTU se utilizó para construir un dendrograma, utilizando el método Ward's y las distancias Bray-Curtis, mediante el programa R (www.r-project.org). Los porcentajes de cada OTU fueron transformados (\log_{10}) y sometidos a análisis de varianza con el procedimiento MIXED del SAS (SAS Institute Inc., EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis jerárquico de la matriz obtenida a partir de los porcentajes de cada OTU, identificadas a nivel de género, muestra una separación de la estructura de las comunidades bacterianas en función de la dieta (Figura 1), ya que la mayor parte de las muestras de los animales que recibieron la dieta C se agrupan conjuntamente y de forma separada a las de las ovejas alimentadas con la dieta MA. Este efecto coincide con el observado en experimentos previos mediante la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos

terminales de restricción (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012).

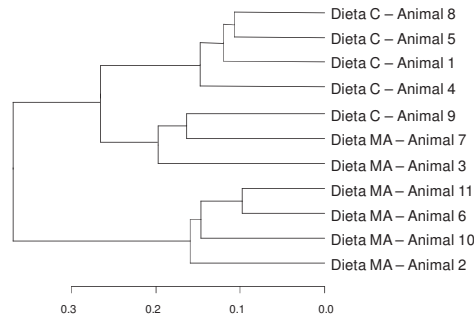


Figura 1. Dendrograma construido utilizando el método Ward's y las distancias Bray-Curtis a partir de los datos de pirosecuenciación del ADN microbiano de la digesta ruminal de ovejas lecheras alimentadas con una dieta suplementada (MA) o no (C) con microalgas marinas.

La técnica de pirosecuenciación proporciona información taxonómica de un elevado número de OTU (Dowd et al., 2008). En este caso, su utilización permitió obtener 57379 secuencias (de media, 5216 por muestra) y realizar asignaciones taxonómicas a nivel de género, así como establecer a qué grupos bacterianos afectaron los tratamientos experimentales. Las abundancias de algunas poblaciones relevantes se presentan en la Tabla 1. Las bacterias del filo *Bacteroidetes*, uno de los grupos mayoritarios en el rumen, fueron claramente dominantes (69%), seguidas por *Firmicutes* (21-26%) y *Proteobacteria* (1-6%). Además, la abundancia de este último grupo aumentó de forma significativa con la dieta MA ($P < 0,01$), lo que se debió a variaciones en especies de la familia *Succinivibrionaceae*. Esto podría indicar que estos microorganismos no son inhibidos por los AGI de cadena larga de las microalgas, o que están implicados en su metabolismo, ya que se ha sugerido que *Succinivibrio dextrinosolvens* podría ser capaz de biohidrogenar (Tokoyama y Davis, 1970).

Tabla 1. Abundancias de diferentes poblaciones bacterianas (datos expresados como \log_{10} del % de todas las secuencias del ARNr 16S - valores no transformados entre paréntesis) en muestras de ADN microbiano de la digesta ruminal de ovejas lecheras alimentadas con una dieta suplementada (MA) o no (C) con microalgas marinas.

Taxonomía	C	MA	EED	P
<i>Bacteroidetes</i>	1,84 (69,2)	1,83 (68,8)	0,032	NS
<i>Bacteroidales (no clasificadas)</i>	0,93 (8,55)	0,70 (5,35)	0,082	*
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,41 (2,66)	-0,19 (0,71)	0,109	***
<i>Prevotellaceae</i>	1,69 (49,3)	1,72 (53,0)	0,039	NS
<i>Prevotella</i>	1,69 (49,3)	1,72 (53,0)	0,039	NS
<i>Firmicutes</i>	1,41 (25,9)	1,32 (21,8)	0,058	NS
<i>Lachnospiraceae</i>	1,02 (10,6)	0,98 (9,9)	0,055	NS
Other	0,70 (5,07)	0,59 (4,50)	0,121	NS
<i>Butyrivibrio</i>	0,41 (2,72)	0,43 (2,74)	0,077	NS
<i>Ruminococcaceae</i>	0,78 (6,24)	0,54 (3,92)	0,108	†
Other	0,34 (2,32)	0,04 (1,26)	0,129	*
<i>Proteobacteria</i>	-0,08 (1,07)	0,68 (6,02)	0,215	**
<i>Succinivibrionaceae</i>	-0,30 (0,76)	0,63 (5,71)	0,258	**

EED, error estándar de la diferencia; P, nivel de significación del efecto de la dieta. NS=no significativo; †= $P < 0,10$; *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$.

Dentro de *Bacteroidetes*, el género *Prevotella* presentó una abundancia muy elevada (49-53%), aunque no varió. En este filo se observaron descensos debido a la inclusión de MA en la dieta en grupos de la familia *Porphyromonadaceae* ($P < 0,001$) y en especies no clasificadas del orden *Bacteroidales* ($P < 0,05$). Algunas de estas especies podrían estar

implicadas en el último paso de la biohidrogenación (i.e., en la formación de ácido esteárico; Huws et al., 2011), el cual suele ser inhibido por los lípidos de origen marino. También podrían estar relacionadas con esta ruta metabólica bacterias de la familia *Ruminococcaceae* (Huws et al., 2011), cuya proporción también disminuyó con la presencia de MA. Las principales bacterias cultivadas capaces de metabolizar los AGI pertenecen a la familia *Lachnospiraceae* (Lourenço et al., 2010) y entre ellas se encuentran especies del género *Butyrivibrio*, aunque estas no se vieron afectadas por el tratamiento ($P > 0,10$). En resumen, la adición de MA a una dieta suplementada con aceite de girasol alteró, tal como se esperaba, la estructura y composición de la comunidad bacteriana. A diferencia de estudios previos con otras técnicas moleculares, la pirosecuenciación permitió detectar todos los componentes de la comunidad bacteriana e identificar aquellas poblaciones afectadas por las MA. Entre estas, y coincidiendo con estudios previos, parecen estar algunas poblaciones implicadas en la biohidrogenación ruminal (*Bacteroidales*, *Porphyromonadaceae*, *Ruminococcaceae*) y otras que podrían estarlo (*Proteobacteria*). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la microbiología del metabolismo lipídico en el rumen es mucho más compleja de lo que sugerían los primeros estudios al respecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P. & Hervás, G. 2010. *J. Dairy Sci.* 93: 3275-3286. ● Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenkov, T., Zaneveld, J. & Knight, R. 2010. *Nat. Methods* 7: 335-336. ● Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeenhan, T., Hagevoort, R. G. & Edrington, T. S. 2008. *BMC Microbiol.* 8: 125-133. ● Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J. & Scollan, N. D. 2011. *Environ. Microbiol.* 13: 1500-1512. ● Lourenço, M., Ramos-Morales, E. & Wallace, R. J. 2010. *Animal* 4: 1024-1036. ● Tokoyama, M. T. & Davis, C. L. 1970. *Fed. Proc.* 29: A691. ● Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V. & Frutos, P. 2012. *J. Dairy Sci.* 95: 794-806. ● Yu, Z. & Morrison, M. 2004. *BioTechniques* 36: 808-812. ●

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (Proy. AGL2011-23700). T. Castro-Carrera disfruta de una beca predoctoral del CSIC (programa JAE) cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

PYROSEQUENCING STUDY OF THE RUMEN BACTERIAL COMMUNITY IN SHEEP FED DIETS SUPPLEMENTED WITH MARINE ALGAE

ABSTRACT: Eleven assaf ewes in lactation were divided in two groups and used to examine, using the pyrosequencing technique, the effect of the dietary inclusion of marine algae (MA) on the structure and composition of the rumen bacterial community. Animals received a total mixed ration based on alfalfa hay and a concentrate (F:C 40:60), supplemented with 25 g of sunflower oil/kg dry matter (DM) plus 0 (Control) or 8 (MA) g of MA/kg DM. After 54 days on treatments, animals were slaughtered and rumen digesta were sampled for microbial analysis by 454 pyrosequencing. Addition of MA altered, as expected, the bacterial community structure and composition. In particular, decreases in the abundance of bacteria that have been previously suggested to be related to rumen biohydrogenation of unsaturated fatty acids (*Bacteroidales*, *Porphyromonadaceae* and *Ruminococcaceae*) were observed, whereas other species of the phylum *Proteobacteria*, particularly those of the family *Succinivibrionaceae*, some of which can potentially biohydrogenate, showed an increase. The use of pyrosequencing, a high throughput sequencing methodology, allowed to establish the taxonomy of the bacterial populations affected by the addition of MA to a diet supplemented with sunflower oil in sheep.

Keywords: lipid supplementation, molecular biology, rumen microbiota, sheep.

COMPARACIÓN DE LA FERMENTACIÓN Y LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RUMEN EN VACAS Y CABRAS ALIMENTADAS CON LA MISMA DIETA

Belenguer^{1*}, A., Frutos¹, P., Bernard², L., Hervás¹, G., Chilliard², Y. y Toral², P. G.

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España

²INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, Francia

*Correo electrónico: a.belenguer@csic.es

INTRODUCCIÓN

La ecología microbiana del rumen está determinada por numerosos factores, entre los que podría incluirse el genotipo del hospedador (McSweeney y Mackie, 2012). Sin embargo, las variaciones en la microbiota ruminal se han relacionado generalmente con diferencias funcionales derivadas de la adaptación evolutiva de las diversas especies de rumiantes (Hofmann, 1989) y, por lo tanto, con diferencias en la dieta consumida (Celaya et al., 2008). Aunque se han descrito desigualdades en el patrón de fermentación ruminal entre distintas especies de rumiantes, alimentados con la misma dieta (Liu et al., 2009), se desconocen aún las posibles variaciones en la estructura de sus comunidades bacterianas del rumen. Por ello, el objetivo de este trabajo fue examinar el patrón de fermentación y la estructura de la comunidad bacteriana ruminal de vacas y cabras, dos de las especies de rumiantes domésticos más comunes, cuando su alimentación es la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 vacas y 14 cabras en lactación, en un diseño de bloques incompletos equilibrados (BIBD) que incluyó 2 tratamientos experimentales (dietas) y 3 lotes dentro de cada especie (4 animales por grupo en el ganado vacuno, y dos grupos de 5 y uno de 4, en ganado caprino). Las dietas tenían heno de pradera como forraje (41%) y diferían en la composición del concentrado: una contenía maíz en grano como principal componente (dieta A) y la otra, más acidogénica, incluía trigo aplastado y aceite de girasol (dieta B; ver Tabla 1). Ambas se ofertaron ad libitum en dos periodos de 28 días. El día 25 de cada periodo, 4 h después de retirar los restos de alimento, todos los animales fueron intubados mediante sonda esofágica para obtener líquido ruminal. Una vez filtrado, se tomaron alícuotas que fueron congeladas inmediatamente a -80°C y posteriormente liofilizadas para el estudio de la comunidad bacteriana mediante la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP). En el resto del líquido obtenido se midió el pH y se tomaron muestras para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco (n=52).

Las concentraciones de amoníaco y AGV se determinaron por colorimetría y cromatografía de gases, respectivamente, según se describe en Belenguer et al. (en prensa). Para el análisis microbiano, las alícuotas de líquido ruminal liofilizado se mezclaron por lote y periodo (n=12). La extracción de ADN microbiano y el análisis mediante T-RFLP se llevaron a cabo según describen Belenguer et al. (en prensa), utilizando tres enzimas de restricción (*HhaI*, *MspI* y *HaellI*) por separado. Los fragmentos terminales de restricción (T-RF) se analizaron en un secuenciador capilar automático Megabace 500 (Amersham Biosciences, Reino Unido), utilizando fragmentos de entre 60 y 900 pares de bases (pb) como patrones. El perfil de picos se obtuvo mediante el programa *GeneMarker* (Softgenetics, EE. UU.) y los datos fueron analizados con el programa R (www.r-project.org). Los parámetros de fermentación ruminal y de los porcentajes del área de los T-RF sobre el área total de picos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza, con el procedimiento MIXED del SAS (SAS Institute Inc., EE. UU.).

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes (g/kg)	Heno de pradera	Maíz (grano)	Trigo (aplastado)	Alfalfa (pellets)	Torta de soja	Aceite de girasol	V/M ¹
Dieta A	410	321	0	173	85	0	7
Dieta B	410	222	222	0	85	50	7

¹ Complemento vitamínico-mineral.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias significativas ni en el pH ruminal ni en la concentración total de AGV entre ambas especies ($P>0,10$; Tabla 2). Sin embargo, la concentración de amoníaco y la proporción molar de los AGV minoritarios fueron en todos los casos superiores en las cabras ($P<0,001$), lo que sugiere una mayor actividad proteolítica en el rumen de esta especie. El porcentaje de acetato fue superior en las vacas ($P<0,05$), mientras que en el caprino el propionato mostró una mayor proporción molar cuando los animales recibían la dieta B y el butirato cuando recibían la A (interacción $E \times D$, $P<0,05$).

Tabla 2. Parámetros de fermentación ruminal y frecuencias relativas sobre el área total de picos (%) de algunos T-RF de diferente longitud (pares de bases, pb), obtenidos a partir del análisis mediante T-RFLP del ADN extraído del fluido ruminal, en vacas y cabras en lactación recibiendo las dietas A o B.

	Dieta A		Dieta B		eed ¹	Prob. ²			
	Vacas	Cabras	Vacas	Cabras		E	D	E×D	
pH	7,10	7,13	7,28	7,29	0,060	ns	**	ns	
Amoniaco (mg/l)	70,6	146,5	34,1	74,9	9,19	***	***	t	
AGV totales (mmol/l)	66,8	50,1	50,8	42,5	8,06	ns	*	ns	
Acetato (%)	70,8	66,9	68,6	62,4	0,99	*	***	t	
Propionato (%)	14,6 ^c	15,0 ^c	19,0 ^b	22,8 ^a	0,85	ns	***	t	
Butirato (%)	11,1 ^a	12,5 ^a	7,9 ^b	7,7 ^b	0,47	ns	***	*	
AGV minoritarios (%) ³	3,5	5,5	4,5	7,1	0,28	***	***	ns	
Bacterias compatibles T-RF (pb)									
<i>Bacteroidetes</i>	102 <i>Hhal</i>	0,81 ^b	0,92 ^b	1,50 ^b	5,04 ^a	0,312	**	***	***
	570 <i>Hhal</i>	0,92	2,78	0,34	0,76	0,452	*	*	ns
	91 <i>Mspl</i>	2,69	5,27	3,63	2,27	0,815	ns	ns	t
	259 <i>Haelll</i>	3,61	2,64	1,99	1,40	0,154	**	***	ns
<i>Succinivibrionaceae</i>	221 <i>Hhal</i>	1,05 ^b	0,22 ^b	4,00 ^a	0,00 ^b	0,552	**	*	*
	492 <i>Mspl</i>	1,28	0,16	8,46	0,38	1,622	*	t	t
	202 <i>Haelll</i>	0,86	0,11	3,77	0,00	0,647	*	t	t

^{a, b, c} distintos superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P<0,05$).

¹eed, error estándar de la diferencia.

²Prob., nivel de significación del efecto de la especie (E), dieta (D) o la interacción ($E \times D$).

ns=no significativo ($P>0,10$); t= $P<0,10$; *= $P<0,05$; **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$.

³Suma de isobutírico, valérico, isovalérico y caproico.

Las diferencias en la fermentación ruminal están seguramente relacionadas con la variación en la estructura de la comunidad bacteriana entre especies y dietas (Figura 1), aunque la dieta B indujo un mayor porcentaje de disimilitud entre vacuno y caprino que la dieta A (50,3 vs. 37,8%). Por su parte, en las cabras las diferencias entre dietas fueron superiores que en las vacas (con disimilitudes de 49,3 vs. 40,7%). También se detectaron diferencias en la frecuencia relativa de numerosos T-RF (Tabla 2), que dependieron en muchos casos de la dieta consumida. Además, se observaron efectos dispares en diversos T-RF (e.g., 102 y 570 pb con *Hhal*, 91 pb con *Mspl*, y 259 pb con *Haelll*) que pueden corresponder a distintas especies del filo *Bacteroidetes*, uno de los más abundantes en el rumen. Algunos microorganismos de este grupo, especialmente del género *Prevotella*, se han relacionado con la actividad proteolítica y la formación de propiónico en el rumen (Dehority, 2003), por lo que es destacable la mayor abundancia relativa detectada en cabras y con la enzima *Hhal* de los fragmentos de 102 pb con la dieta B y de 570 pb con la dieta A, ambos compatibles con distintas bacterias de la familia *Prevotellaceae*. Por otro lado, la presencia de aceite de girasol parece haber favorecido la proliferación de distintas poblaciones relacionadas con el metabolismo lipídico, tales como las ya mencionadas de la familia *Prevotellaceae* (Huws et al., 2011) en caprino, o especies de la familia *Succinivibrionaceae* (Tokoyama y Davis, 1970) en vacuno, compatibles con fragmentos que mostraron una mayor proporción relativa en esta última especie con la dieta B (221 pb con *Hhal*, 492 pb con *Mspl*, y 202 pb con *Haelll*). Nuestros resultados, por lo tanto, mostrarían no solo un efecto de la especie, de la dieta y de su interacción sobre el patrón de fermentación y la estructura de la comunidad bacteriana

ruminal, sino también, lo que parece más interesante, una importancia similar de los efectos de la especie hospedadora y de la dieta consumida.

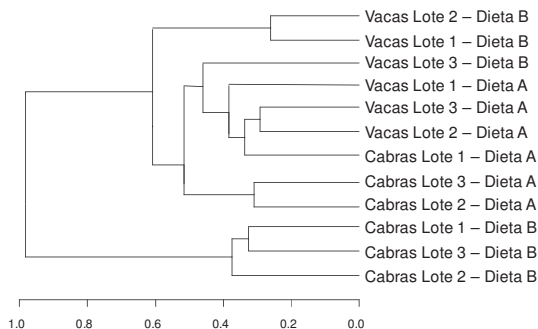


Figura 1. Dendrograma obtenido utilizando el método Ward´s y las distancias Bray-Curtis a partir del análisis mediante T-RFLP del ADN extraído del fluido ruminal de vacas y cabras en lactación recibiendo la dieta A o la dieta B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer, A., Ben Bati, M., Hervás, G., Toral, P. G., Yáñez-Ruiz, D. R. & Frutos, P. 2013. *Animal* (en prensa).
- Celaya, R., Benavides, R., García, U., Ferreira, L. M. M., Ferre, I., Martínez, A., Ortega-Mora, L. M. & Osoro K. 2008. *Animal* 2: 1818-1831.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen Microbiology* (Ed Dehority B. A.) Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido
- Hofmann, R. R. 1989. *Oecologia* 78: 443-457.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J. & Scollan, N. D. 2011. *Environ. Microbiol.* 13: 1500–1512.
- Liu, Q., Dong, C. S., Li, H. Q., Yang, W. Z., Jiang, J. B., Gao, W. J., Peng, C. X. & Liang, Z. Q. 2009. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154: 151-159.
- McSweeney, C. & Mackie, R. 2012. Background Study Paper No. 61. Commission on Genetics Resources for Food and Agriculture, FAO.
- Tokoyama, M.T. & Davis, C.L. 1970. *Fed. Proc.* 29, A691.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proy. AGL2011-23700) y la UMR1213 (INRA, Francia). P. G. Toral disfruta de una beca posdoctoral de la Fundación Alfonso Martín Escudero.

COMPARISON OF THE RUMEN FERMENTATION AND BACTERIAL COMMUNITY IN COWS AND GOATS FED THE SAME DIET

ABSTRACT: Twelve cows and 14 goats were used to examine differences between species in the rumen fermentation pattern and bacterial community structure when animals received the same diet. The balanced incomplete block design included 3 groups per species and 2 treatments (diets), differing in the concentrate composition: with corn as the main component (A diet) or with wheat plus sunflower oil (B diet). After 25 days of each of 2 periods, rumen fluid was collected using a stomach tube for microbial studies and pH, ammonia and volatile fatty acid (VFA) analysis. Differences in rumen fermentation due to species, diets and their interaction were observed, with greater ammonia concentrations and molar proportions of minor VFA, and lower percentages of acetate, in goats. Proportions of propionate and butyrate were higher in goats on B and A diets, respectively. Several terminal restriction fragments (T-RF) also showed different relative frequencies due to species, diets and their interaction. Thus, some T-RF compatible with *Prevotellaceae* were more abundant in goats, whereas others that may correspond to *Succinivibrionaceae* were greater in cattle given B diet. According to the percentages of dissimilarity between bacterial communities, the rumen ecosystem was affected alike by the diet consumed and the ruminant species.

Keywords: bovine, caprine, bacterial species, T-RFLP.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON TIOSULFINATO SOBRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS Y EL PERFIL DE ARQUEAS METANOGÉNICAS EN EL RUMEN DE CAPRINO

Martínez-Fernández, G., Abecia, L., Ramos-Morales E., Martín-García A.I., Molina-Alcaide E. y Yáñez-Ruiz, D. R.

Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1. 18008, Granada.

gonzalo.martinez@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años diferentes estudios han demostrado que la adición de distintos compuestos activos de plantas y diferentes dietas pueden modificar la diversidad de las poblaciones de arqueas metanogénicas (Zhou et al., 2010) sin afectar a la concentración de arqueas del rumen (Ohene-Adjei et al., 2008). Sin embargo, estudios recientes obtenidos *in vivo*, respecto a las arqueas metanogénicas, con diversos compuestos y componentes de la dieta con efecto antimetanogénico aún arrojan resultados variables y contradictorios (Patra y Yu, 2012; Romero-Huelva, 2012). Así mismo, la concentración de otros grupos microbianos, como los protozoos, se ha visto afectada por estos compuestos en algunos estudios (Kongmun et al., 2011; Patra y Yu, 2012) mientras que en otros no ocurre (Abecia et al., 2012). Parte de esa variabilidad puede estar relacionada con la naturaleza de los agentes utilizados, aunque también con el tiempo de tratamiento. Estudios recientes de pirosecuenciación, llevados a cabo por nuestro grupo, reflejan que la adición durante 12 días del aditivo propil propano tiosulfato (PTS) en fermentadores de flujo continuo, originó un cambio en la diversidad de arqueas (Martínez et al., 2012). Por ello, este trabajo se planteó con el objetivo de estudiar el efecto de la adición de PTS sobre las poblaciones microbianas y la diversidad de arqueas metanogénicas en el rumen de caprino tras 14 y 28 días de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 cabras adultas, canuladas en rumen, de raza murciano-granadina, distribuidas en 2 grupos en función de su peso vivo ($37,6 \pm 5,81$ kg). Los animales se alimentaron a nivel mantenimiento energético (Prieto et al., 1990) con una dieta basada en heno de alfalfa y concentrado en relación 1:1 (Ingredientes concentrado: Harinilla de trigo 35%, cebada 21%, torta de girasol 15%, harinilla de maíz 9%, sorgo 8%, harina de soja 5%, cáscara de soja 4% y 3% de corrector vitamínico), durante un periodo de adaptación de 12 días. Durante los siguientes 30 días los animales recibieron la misma dieta, tratándose a 5 de ellos con PTS y a los 5 restantes sin administración del aditivo (control). El PTS (pureza del 9% fijado en alfa-ciclodextrina) se administró de manera creciente durante 5 días para facilitar la adaptación de los animales al aditivo hasta alcanzar la dosis experimental (0,2 g/kg peso vivo), que se repartió en 2 tomas diarias. En cada toma el PTS se pesaba en papel de celulosa junto con un 1 g de cebada molida a 1 mm y se introducía en el rumen a través de la cánula. A los animales del grupo control también se le introdujo, a través de la cánula, 1 g de cebada molida a 1 mm en papel de celulosa en los mismos momentos y de la misma manera que se procedía con el PTS. Los animales se alimentaron dos veces al día y la ingestión de alimento se controló diaria e individualmente. Los días 14 y 28 se tomaron alícuotas de 10 mL del contenido ruminal de los animales, antes de la primera toma del alimento, congelándose a -80°C y liofilizándose posteriormente. A partir de las muestras liofilizadas (0.05 g) se realizó la extracción de ADN total utilizando el kit QIAmp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). El ADN se empleó para la cuantificación absoluta de bacterias totales, protozoos y arqueas metanogénicas mediante PCR a tiempo real, siguiendo la metodología descrita por Abecia et al. (2012a). El número de copias génicas se expresó por unidad de muestra fresca de la que procedía el extracto de ADN. La estructura de la comunidad de arqueas metanogénicas se estudió mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). Para ello, el ADN extraído anteriormente se amplificó por PCR usando los cebadores del gen *mcrA*, específico para la comunidad de arqueas (Abecia et al., 2012b). La imagen se analizó usando el programa Quantity One, construyéndose el dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA a partir del coeficiente Dice. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de la varianza de una sola vía por medio del programa SPSS 19.0[®]. Las diferencias ($P < 0,05$) entre medias se establecieron utilizando el test DMS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de copias de bacterias totales, arqueas metanogénicas y protozoos presentes en el rumen de las cabras (tabla 1), no mostró diferencias ($P \geq 0,149$) debidas al tratamiento ni el día 14 de muestreo ni el 28. La similitud de la comunidad de arqueas metanogénicas en las cabras los días 14 y 28 tras el inicio del tratamiento se muestra en la Figura 1. El dendograma muestra que las arqueas correspondientes al contenido ruminal, tomado el día 28, de animales tratados con PTS se agruparon mayoritariamente separadas con respecto al resto de las muestras estudiadas (4 animales de 5). Por el contrario, los animales tratados con PTS el día 14 no se diferenciaron de los animales control, apuntando a una posible diferenciación entre los días 14 y 28. Los niveles de similitud de la comunidad de arqueas de los animales tratados con PTS a los 28 días del inicio del tratamiento y agrupados en el mismo *cluster* fueron superiores al 60%. El índice Shannon de biodiversidad no se vio modificado por el tratamiento con PTS en ninguno de los días. Los resultados observados en cuanto a la concentración de bacterias totales, arqueas y protozoos en este trabajo concuerdan con los observados por Abecia et al. (2012a) utilizando como compuesto antimetanogénico bromoclorometano que no afectó a la biomasa de las poblaciones microbianas del rumen de cabras adultas en lactación, en las que se observó un descenso de la producción de metano. Por otra parte Romero-Huelva (2012), en cabras alimentadas con dietas que redujeron la producción de metano tampoco observó modificaciones en la densidad de bacterias totales, ni en animales en mantenimiento ni en lactación, aunque la densidad de las arqueas metanogénicas aumentó en animales en mantenimiento y no se modificó en cabras en lactación. Otros autores (Kongmun et al., 2011) no observaron efectos significativos en búfalos tratados con derivados del ajo sobre las poblaciones de arqueas ni las bacterias totales en el rumen cuando se redujo la producción de metano, mientras que el número de protozoos sí se vio afectado. Respecto a la similitud en las comunidades de arqueas, observada el día 28 en animales tratados con PTS, nuestros resultados concuerdan con la evidencia de un aumento de la diversidad en las poblaciones de arqueas metanogénicas en ovejas tratadas con aceite de ajo y otros aceites esenciales observada por Ohene-Adjei et al. (2008). En este sentido, Zhou et al. (2010) han demostrado que animales con una menor producción de metano poseían una comunidad de arqueas en el rumen diferente, en comparación con los que producían más metano, independientemente de la biomasa total de arqueas en el rumen. Por último cabe destacar que el estudio, mediante pirosecuenciación (Martínez et al., 2012), de las muestras procedentes de fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino y tratados con PTS durante 12 días, originó una reducción de arqueas del orden *Methanomicrobiales* asociada a un descenso de la producción de metano. En conclusión, los resultados de este trabajo concuerdan con otros estudios acerca del efecto de compuestos derivados del ajo sobre la distribución de grupos de arqueas en el ecosistema ruminal, aunque la biomasa total de arqueas, bacterias y protozoos en el rumen no se vea afectada. Además, los cambios inducidos en el grupo de arqueas solo se manifiestan tras un tiempo relativamente prolongado de tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia L., Toral P., Martín-García A., Martínez G., Tomkins N., Molina-Alcaide E., Newbold C. & Yáñez-Ruiz D. 2012a. *J. Dairy Sci.* 95:2027-2036. ● Abecia L., Rodríguez-Romero N., Yáñez-Ruiz D.R. & Fondevila M. 2012b. *Anaerobe.* 18:344-349. ● Kongmun P., Wanapat M., Pakdee P., Navanukraw C. & Yu Z. 2011. *Livest. Sci.* 135:84-92. ● Martínez G., Abecia L., Snelling T., Martín-García A.I., Ramos E., Molina-Alcaide E., Newbold C.J. & Yáñez-Ruiz D.R. 2012. *Proceedings in: 8th INRA-ROWETT Symposium on Gut Microbiol.* 147. ● Romero-Huelva M. 2012. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. ● Ohene-Adjei S., Chaves A., McAllister T., Benchaar C., Teather R. & Forster R. 2008. *Microbial Ecol.* 56:234-242. ● Patra A.K. & Yu Z. 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4271-4280. ● Prieto C., Aguilera J., Lara L. & Fonollá J. 1990. *Br. J. Nutr.* 63:155-163. ● Zhou M., Hernandez-Sanabria E. & Guan L.L. 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6524-6533.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2008-04707-C02-01). G. Martínez agradece la ayuda técnica a E. Jiménez, T. García, F. Ramos y P. Rufino.

EFFECTS OF THE ADDITION OF THYOSULFINATE ON RUMEN MICROBIAL POPULATIONS AND ARCHAEAL DIVERSITY IN GOATS

ABSTRACT: Ten non-lactating goats were used to test the effect of propyl propane thiosulfinate (PTS) on microbial population biomass and archaeal diversity after 14 and 28 days of treatment. All goats received a diet based on alfalfa hay and a concentrate (F:C 1:1) and were divided in two groups. Treated animals received increasing doses of PTS during the first 5 days and then 0.2 g/kg BW per day of PTS. Total bacteria, protozoa and methanogenic archaea were quantified by using qPCR. Archaeal biodiversity was determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Neither total bacteria, protozoa and Archaea concentration were affected by the PTS treatment ($P \geq 0.149$) on days 14 and 28 of the trial. However, on day 28 archaeal community structure in animals treated with PTS was different as compared with control.

Keywords: propyl propane thiosulfinate, microbial population, rumen, goats.

Tabla 1. Efecto del tratamiento con PTS durante 14 y 28 días sobre la concentración (\log_{10} copias del gen/g materia fresca) de bacterias totales (ARNr16S), protozoos (ARNr18S) y arqueas metanogénicas (*mcrA*) en el rumen de cabras.

Log ₁₀ copias del gen/g MF		Control	PTS	EEM	P-valor
Bacterias totales	Día 14	9.84	9.85	0.067	0.977
	Día 28	9.91	9.93	0.045	0.843
Protozoos	Día 14	8.16	8.26	0.068	0.489
	Día 28	8.35	8.45	0.052	0.372
Metanogénicas	Día 14	8.51	8.57	0.092	0.751
	Día 28	8.84	8.64	0.066	0.149

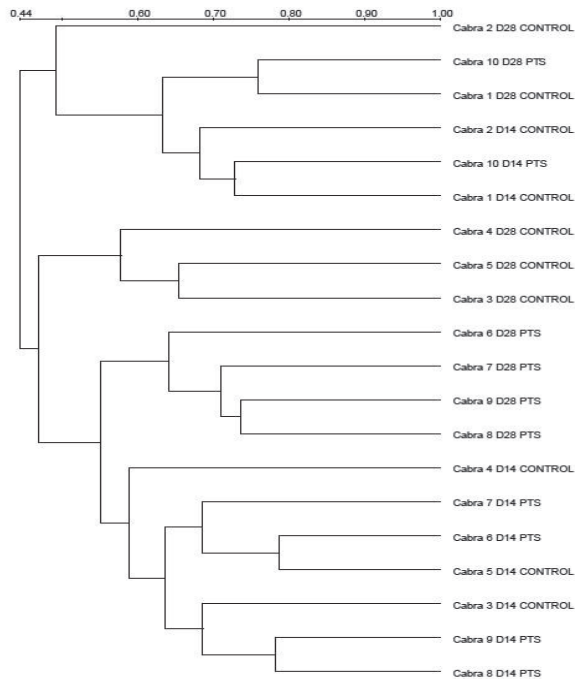


Figura 1. Dendrograma derivado del análisis de DGGE de la similitud en la población de arqueas del rumen de cabras tratadas durante 14 y 28 días con propil propano tiosulfinato (PTS) y no tratadas (control).

ESTUDIO MEDIANTE PIRO-SECUENCIACIÓN DE LA COMUNIDAD DE ARQUEAS EN EL RUMEN DE CABRAS TRAS LA INTERVENCIÓN CON UN COMPUESTO ANTIMETANOGENICO DURANTE EL PERIODO DE LACTACION

Abecia¹, L., Lewis², K., Martínez¹, G., Martín-García¹, A.I., Newbold², C.J. y Yáñez-Ruiz¹, D. R.

¹Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España.

²IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth, SY23 3DA, Reino Unido.
leticia.abecia@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

En rumiantes, la producción de metano (CH₄) representa una pérdida de entre el 2 y el 12% de la energía bruta ingerida (Johnson y Johnson, 1995). En particular, en los animales lactantes de alta producción, se estima que la producción de metano constituye una pérdida de alrededor del 6% (Tamminga et al., 2007). Se han utilizado varias estrategias nutritivas para reducir las emisiones de metano en rumiantes, aunque hasta ahora con una aplicación limitada en el sector lechero. Por otro lado, se han testado *in vitro* varios compuestos con el potencial de modificar la fermentación del rumen a través de la manipulación del ecosistema microbiano, pero muy pocos se han utilizado con éxito *in vivo* y casi ninguno en animales en lactación (McAllister y Newbold, 2008). Uno de los mayores problemas del uso de aditivos antimetanogénicos *in vivo* está relacionado con la degradación de los compuestos activos por los microorganismos del rumen o con la adaptación de la microbiota del rumen al tratamiento (Hart et al., 2008). Además, Zhou et al. (2009) sugieren que más que el número, es la composición de especies metanogénicas presentes en el rumen lo que determina la metanogénesis del animal.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de un compuesto, con probada actividad anti-metanogénica (Abecia et al. 2012), en la dieta de cabras lactantes sobre la comunidad de arqueas del rumen mediante piro-secuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 18 cabras de raza murciano-granadina (43±1,7 kg de peso vivo) alojadas en habitáculos individuales en un establo alimentadas con heno de alfalfa y concentrado. Tras el parto se establecieron al azar 2 grupos experimentales de 9 cabras cada uno. Al grupo de cabras positivas (**Pos**) se le suministró durante el período de lactación de las crías (8 semanas) un hidrocarburo alifático halogenado, denominado bromoclorometano (BCM), envuelto en una matriz de α -ciclodextrina (May et al., 1995) en forma de polvo blanco con una riqueza en BCM de 10-12%. El preparado de BCM se administró a una dosis de 0,30 g/100 kg PV dos veces al día. Al grupo de cabras control (**Neg**) no se le suministró ningún aditivo. Se tomaron muestras del contenido ruminal mediante sonda esofágica en la semana 8. Tras la extracción de ADN total (QIAamp DNA Stool Kit), se amplificó la región hipervariable V6 del gen *ARNr 16S* de arqueas (set de primers: 958F and 1048arcR-major, Galand et al., 2009). Los amplicones fueron purificados (AMPure XP Kit) y la librería cuantificada en un BioAnalyser 2000 (Agilent). Las muestras fueron secuenciadas en un equipo Roche 454 FLX Titanium siguiendo el protocolo del fabricante. Los resultados se analizaron con el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.5.0) (Caporaso et al., 2010) y para corregir los errores de homopolimeros se utilizó el programa Acacia (v1.52) (Bragg et al., 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BCM es uno de los inhibidores de metano más eficientes, reduciendo su producción interfiriendo con la coenzima metil transferasa cobamida-dependiente en la ruta de la metanogénesis (Chalupa et al., 1977). El tratamiento de estos animales con este compuesto resultó en un descenso significativo de la producción de metano de un 30 % (21,6 vs. 14,4 l/kg MS ingerida) tal y como se muestra en Abecia et al. (2012).

El análisis taxonómico de la comunidad de arqueas (Figura 1A) utilizando el clasificador BLAST reveló que la adición de BCM modificó la abundancia relativa de la familia

Methanobacteriaceae. En concreto el género *Methanobrevibacter* incremento de 87 % a 92% al tratar con BCM. Como resultado, el género *Methanosphaera* decreció en proporción tras el tratamiento con BCM (de 11.6 a 7.6 %). Respecto a la familia Methanosarcinaceae, el tratamiento afectó al género *Methanimicrococcus* que desapareció en el rumen de los animales tratados.

El dendrograma de la Figura 1B confirma que la variación en la distribución de los distintos grupos de arqueas hace que las comunidades en las cabras control (Neg) y tratadas (Pos) sea diferente, puesto que están agrupados claramente en dos clados filogenéticamente muy distantes.

Las arqueas metanogénicas son un grupo diverso y complejo que aún es bastante desconocido. El desarrollo reciente de técnicas moleculares ha llevado a la identificación de un rango amplio de especies de la comunidad metanogénica y que en la actualidad no han logrado cultivarse en el laboratorio, como muestra la bibliografía reciente. Kim et al. (2011) describió que *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* y *Methanosphaera* representaban el 50, 15 y 13 % de las secuencias totales analizadas del rumen mediante colección de clones, respectivamente. Por el contrario, en el estudio posterior de Lee et al. (2012) casi todas las secuencias de arqueas formaron un nuevo linaje filogenético distinto de los conocidos como metanogénicos hasta el momento y por ello casi todas las secuencias de arqueas fueron categorizadas como género sin clasificar. Sin embargo estos resultados difieren con trabajos previos que mostraban que *Methanobrevibacter* sp. o miembros de la familia *Methanobacteriaceae* son los que representan la mayoría de los grupos presentes en el rumen. Esto indica que todavía queda un gran campo por investigar. En cualquier caso, el análisis de las secuencias realizadas en este trabajo muestra un predominio del grupo *Methanobrevibacter*.

Mitsumori et al. (2012) concluyeron que la metanogénesis en cabras tratadas con BCM se inhibió en un 80%, incrementando la concentración ruminal de H₂ sin afectar la ingestión de materia seca ni la digestibilidad del alimento. La respuesta al BCM de las distintas especies de arqueas parece estar determinada por la presión parcial de H₂ en el ambiente ruminal como resultado de la inhibición de la metanogénesis. Aunque a nivel de estructura se observa una clara diferencia en la distribución de especies presentes en cada ambiente ruminal, el tamaño de amplicon utilizado en este trabajo no nos permite llegar a nivel de especie, lo que limita las conclusiones de este trabajo.

Los resultados de este trabajo (en conjunción con lo publicado en Abecia et al. 2012), muestran que la inhibición selectiva de algunos grupos de arqueas está detrás de la reducción de la producción de metano en el rumen y que en condiciones en que la presión parcial de H₂ se incrementa, otros grupos ocupan ese nicho sin afectar a la funcionalidad del rumen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, L., Toral, P., Martín-García, A., Martínez, G., Tomkins, N., Molina-Alcaide, E., Newbold, C. & Yáñez-Ruiz, D. R. 2012. J. Dairy Sci. 95: 2027-2036.
- Bragg, L., Stone, G., Imelfort, M., Hugenholtz, P., Tyson, G.W. 2012. Nat Methods 9:425-426.
- Caporaso, J. G., et al. 2010, Nat Methods 7: 335-336.
- Chalupa, W. 1977. J. Anim. Sci. 46: 585-599.
- Galand P. E., Casamayor E. O., Kirchman D. L., Potvin M. & Lovejoy C. 2009. ISMEJ 3: 860-869
- Hart, K.J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., Newbold, C.J. 2008. Anim. Feed Sci. Technol. 147: 8-35.
- Johnson, K.A. & Johnson, D. E. 1995. J. Anim. Sci. 73: 2483-2492.
- Kim, M., Morrison, Yu. Z. 2011. FEMS Microb Ecol, 76: 49-63.
- Lee, H. J., Jung, J. Y., Oh, Y. K., Lee, S. S., Madsen, E.L., Jeon, C.O. 2012. Appl. Environ. Microbiol. 78: 5983-5993.
- May, C., Payne, A., Stewart, P. & Edgar J. 1995. International patent application no. PCT/AU95/00733.
- McAllister, T. A., Newbold, C. J. 2008. Aust. J. Exp. Agric. 48: 7-13.
- Mitsumori, M., Shinkai, T., Takenaka, A., Enishi, O., Higuchi, K., Kobayashi, Y., Nonaka, I., Asanuma, N., Denman, S. E., McSweeney, C. S. 2012. Br. J. Nutr. 108: 482-491.
- Tamminga, S., Bannink, A., Dijkstra, J., Zom, R. 2007. Feeding strategies to reduce methane loss in cattle. Report 34. Animal Sciences Group, Wageningen UR, Lelystad, the Netherland.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L. L. 2010. Appl. Environ. Microbiol. 76: 3776-3786.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Europea (Marie Curie Reintegration Grant 224816–METANORUMEN). L. Abecia agradece la concesión de un contrato postdoctoral del programa JaeDoc del CSIC y a E. Jimenez y S.E. Girdwood la asistencia técnica.

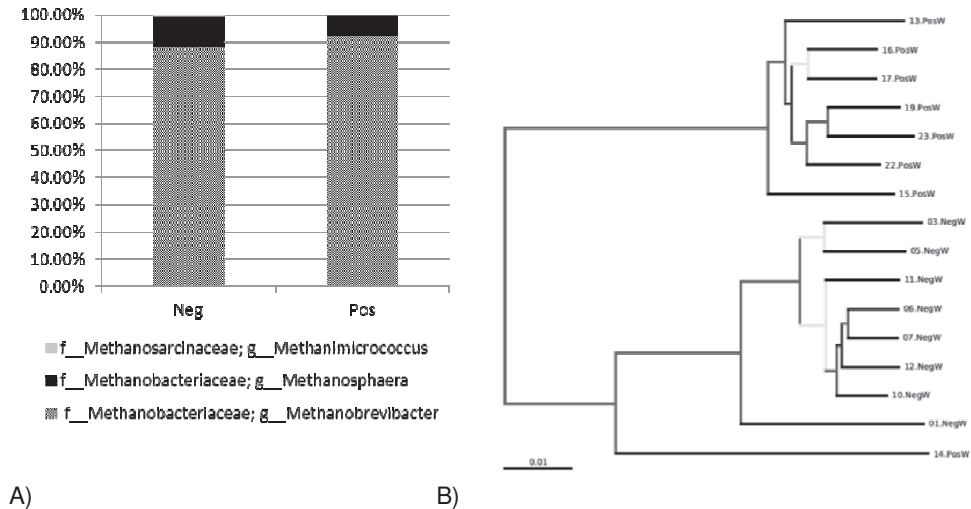


Figura 1. A) Abundancia relativa (% de secuencias) en el contenido ruminal de las hembras tratadas (Pos) o no (Neg) con bromoclorometano durante el periodo de lactación al destete B) Dendrograma representando la similitud de la comunidad metanogenica de arqueas en el rumen de las hembras al destete.

STUDY OF THE ARCHAEL COMMUNITY IN THE RUMEN OF GOATS AFTER NUTRITIONAL INTERVENTION WITH ANTI-METHANOGEN COMPOUND DURING LACTATION PERIOD BY PYRO-SEQUENCING

ABSTRACT: Several technologies have been tested to reduce enteric methanogenesis, but very few have been successfully used in practical conditions for livestock. Furthermore, the consequences of reducing rumen methane production on animal performance and milk quality are poorly understood. The aim of this work was to investigate the effect of feeding bromochloromethane (BCM), a halogenated aliphatic hydrocarbon with potential antimethanogenic activity, to dairy goats on rumen archaea community by pyrosequencing. Sixteen goats giving birth two kids were used. Eight goats were treated (Pos) with bromochloromethane after giving birth over the lactation period. The other 8 goats were not treated (Neg). Rumen samples from goats were collected from both experimental groups at weaning (8 weeks). Nutritional intervention with BCM affected the structure of methanogenic archaea species. Relative abundance of the family *Methanobacteriaceae* was modified with BCM. The genus *Methanobrevibacter* slightly increased and *Methanosphaera* decreased in Pos compared to Neg. Further research is needed in this field.

Keywords: bromochloromethane, ruminal colonization, goat, methanogens.

ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES METANÓGENAS EN LA DIGESTION ANAEROBIA DEL PURÍN Y SU RELACIÓN CON EL APORTE EXÓGENO DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES O ARQUEAS EXÓGENAS

Seradj A. R.¹, Morazán H.¹, Alvarez J.¹, Abecia L.², Babot D.¹, Yañez-Ruiz DR.², Balcells J.¹.

¹Department de Producció Animal. ETSEA, Universitat Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure 191. 25198 Lleida. España. ²Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España
balcells@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El metano (CH₄) procede de la fermentación anaerobia de la materia orgánica (MO) y su toxicidad radica fundamentalmente en la contribución al calentamiento global de la atmósfera (Philippe et al., 2007). Su origen es tan diverso como lo son los ecosistemas naturales en los cuales la MO es fermentada en anaerobiosis. Sin embargo, la emisión derivada de la ganadería tiene dos orígenes principales, la fermentación digestiva (rumen y tracto ceco-colónico) y la emisión procedente de las deyecciones (Flotats et al., 2009). Esta última, debe ser tratada bajo una doble perspectiva, su toxicidad medio ambiental y la posibilidad de fermentar, de forma controlada, la MO a CH₄ (*metanización*). En este último caso el purín puede ser considerado como una fuente potencial de energía renovable (Flotats et al., 2009). La producción de CH₄ obedece a la actuación sinérgica de un consorcio microbiano sobre el sustrato. Una posición crucial en este proceso lo ocupan las arqueas metanógenas cuya actividad conduce a la síntesis final de CH₄. El objetivo del presente ensayo es analizar el efecto de incorporación de carbohidratos y arqueas exógenas sobre la evolución de las principales especies metanógenas y su biodiversidad en la digestión anaerobia de purines de cerdo.

MATERIAL Y METODOS

El purín [inoculo, 4% MS] se preparó a partir de heces frescas obtenidas por extracción rectal y orina extraída por masaje vulvar de cerdas adultas (Centre d'Estudis Porcins Torrelameu, Lleida) recibiendo una dieta comercial. Como co-inóculo (Co-i: fuente exógena de arqueas) se utilizaron heces bovinas liofilizadas. Como sustrato, se utilizaron tres fuentes de carbohidratos estructurales (CHO: Paja de cebada y dos pulpas, remolacha y manzana). La digestión anaerobia del purín (60 ml) se realizó mediante el procedimiento *in vitro* descrito por Theodorou et al., (1994). Se utilizaron tres niveles de co-inóculo (0, 5 and 10% de la MS inicial y 600 mg de los diferentes sustratos (CHO) así como cuatro replicas (botellas) por tratamiento. Las botellas se incubaron (39±1 °C) durante 56 días, la producción de gas se determinó a partir de la presión del espacio de cabeza de las botellas y la concentración de CH₄ por cromatografía de gases. Una réplica de cada botella se abrió a los 0, 25 y 56 días para determinar la concentración de bacterias y arqueas y la biodiversidad de arqueas hidrogenotrofas.

El ADN se extrajo mediante el Kit QIAamp® DNA Stool Mini (Qiagen Ltd, West Sussex, UK). La cuantificación se realizó (qPCR) empleando cebadores específicos de bacterias (Denman y McSweeney, 2005) y arqueas totales (Matarazzo et al., 2011), así como de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (Denman et al., 2007). El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría, diluido (de 10⁻¹ a 10⁻⁵) y utilizado como estándar para la cuantificación del ADN bacteriano, arqueas totales y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas. La abundancia relativa de los diferentes grupos microbianos respecto a las bacterias totales se realizó a partir del procedimiento descrito por Livak and Schmittgen (2001). Las PCR a tiempo real se realizaron según el procedimiento descrito por Yañez-Ruiz et al. (2010). Para la DGGE se utilizaron cebadores específicos para arqueas (Cheng et al., 2009). La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 8% con un gradiente desnaturante de urea/formamida (40-60%) durante 16 horas a 80V. La tinción de los geles se realizó utilizando un kit de tinción de plata (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y tras ser escaneado se analizó utilizando el programa QuantityOne.

RESULTADOS Y DISCUSION

A lo largo del periodo experimental (d0 hasta el d56) la concentración bacteriana disminuyó de forma paulatina (Tabla 1) sin que la adición de diferentes fuentes de CHO alterara, ni la concentración total de bacterias ni su descenso. La adición del Co-i sí alteró la concentración de bacterias totales pero dicho efecto mostró un efecto diferencial entre los dosis de Co-i (Interacción Co-i x Días $P < 0.05$). Efectivamente al suplementar con un 5 %, la concentración de bacterias descendieron (d0 hasta el d25) para mantenerse posteriormente (d56), sin embargo al incrementar la dosis (10 % Co-i) el descenso fue paulatino (hasta el d56) [Interacción Co-i x Día; $P < 0.05$]. El tiempo de incubación redujo también la concentración de arqueas totales ($P < 0.05$) aunque en este caso la reducción observada fue independiente de la adición y dosis de Co-i. Contrariamente a la evolución de las arqueas totales, las poblaciones hidrogenotróficas mantuvieron sus títulos durante el periodo de incubación e incrementaron con la adición y dosis de Co-i ($P < 0.05$). En el análisis de biodiversidad (DGGE) la mayor parte de las bandas se repitieron en el gel lo que reflejaría el origen común de las muestras. No obstante, el patrón de bandas–DGGE mostró que, tanto el periodo de incubación como la presencia del Co-i pueden alterar la estructura de la población como demuestra el dendrograma (Figura 1). La estructura poblacional de arqueas en los diferentes tiempos de incubación (0, 25 y 56 días) fueron más parecidas que las estructuras observadas dentro de cada tiempo de incubación. Es posible que las diferentes especies de metanógenas puedan mostrar diferentes capacidades y eficiencias de adaptación a cambios en el medio (purín) capaces de explicar las diferencias registradas (Dabert et al., 2008). La predominancia de metanógenos hidrogenotróficos en el sistema digestivo de los rumiantes explicó la relación positiva entre los títulos de estas poblaciones y la adición de Co-i al medio, del mismo modo la lenta capacidad de estas especies para adaptarse a cambios en el sustrato (Snell-Castro et al., 2005) explicarían los cambios registrados en sus títulos durante el periodo de incubación. El incremento en la concentración de metanógenos hidrogenotróficos no modificó la producción total de CH_4 pero sí el ritmo al que el valor máximo se alcanzó. Sin embargo, la suplementación con fuentes de carbohidratos estructurales de diferente naturaleza no mostró ningún efecto sobre las poblaciones objeto del presente estudio.

AGRADECIMIENTOS: trabajo ha sido financiado por el MINECO (Proy. AGL2020-20820). A.R, Seradj ha sido financiado por una Beca AGAUR (FI-DGR 2011)

Tabla 1. Concentración en medio y biodiversidad (DGGE) de bacterias totales, (metanogénicas (AM))arqueas totales (AT) y arqueas metanogénicas hidrogenotrofas (AMH) registradas al fermentar purín de cerdo en diferentes condiciones

Item	Días			Co-inóculo			SEM	P-Valor		
	0	25	56	0	5%	10%		Día	Ci	Ci x Día
Total bacteria	15.1	4.7	3.1	9.0	7.9	6.0	0.56	**	**	**
AT	0.5	0.3	0.1	0.2	0.4	0.4	0.43	**	ns	ns
AMH	0.1	0.6	0.3	0.0	0.3	0.7	0.16	ns	*	ns
Biodiversidad										
Riqueza	22.7	26.5	25.8	24.7	24.3	26.0	0.48	**	**	**
Indice Shannon	3.1	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2	0.02	**	*	**
Uniformidad	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.004	***	*	**

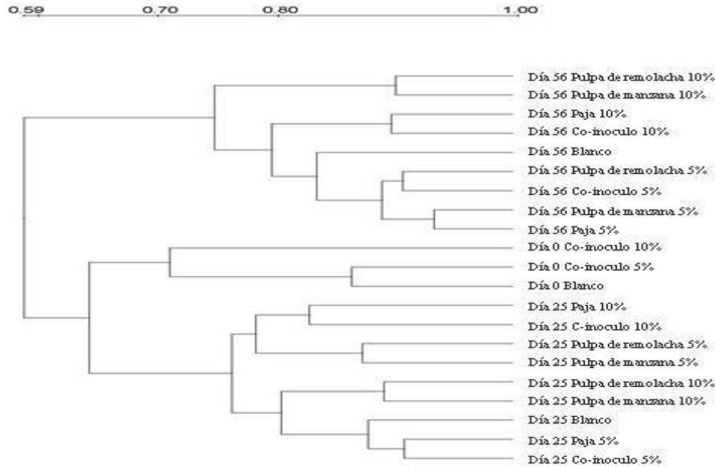


Figura 1. Dendrograma de la población de arqueas obtenido mediante DGGE

REFERENCES

- Cheng, Y.F., Mao S.Y., Liu, J.X., & Zhu, W.Y. 2009. *LettApplMicrobiol*.48:585-92. • Dabert, P., Védrenne, F., BRARD, C., & Béline, F. 2008. In 13th Ramiran international conference, Potential for simple technology solutions in organic manure management, (Albena, France), pp. 96-99. • Denman, S. E., & McSweeney, C. S. 2005. Quantitative (real-time) PCR. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*, 105-115. • Denman, S. E., Tomkins, N. W., & McSweeney, C. S. 2007. *FEMS Microbiol Ecol*62: 313-322. • Flotats, X., Bonmatí, A., Fernández, B., & Magrí, A. 2009. *Bioresource Technology*100:5519-5526. • Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. *Methods*25:402-408. • Matarazzo, F., Ribeiro, A. C., Feres, M., Faveri, M., & Mayer, M. P. A. 2011. *J Clinical Periodontology*38:621-627. • Philippe, F. X., Laitat, M., Canart, B., Vandenheede, M., & Nicks, B. 2007. *Animal*1:1515-1523. • Snell-Castro, R., Godon, J. J., Delgenès, J. P., & Dabert, P. 2005. *FEMS Microbiol Ecol*52:229-242. • Yáñez-Ruiz, D. R., Macías, B., Pinloche, E., & Newbold, C. J. 2010. *FEMS Microbiol Ecol*72:272-278.

STUDY OF METHANOGENS POPULATION THROUGH ANAEROBIC FERMENTATION OF PIG SLURRY: EFFECT OF CARBOHYDRATES AND EXOGENOUS ARCHAEAS SUPPLY

ABSTRACT:

Three agricultural by products (CHO:wheat straw, apple pulp and sugar beet pulp) as substrate plus 2 levels of freeze-dried cow's feces (CO-i: 5 and 10 %) as co-inoculum were assigned in quadruplicate during 56 days of in vitro fermentation. Bottles were sampled at days (D) 0, 25 and 56 to determine the evolution of total bacteria, total and hydrogenotrophic methanogens archaea. DGGE was used to study archaea biodiversity in the slurry incubations. CHO addition did not alter bacteria titres but co-i interacts with D ($P<0.001$), in 5% total bacteria decreased significantly (d0 to d25) but remained steady until d56 ($P>0.05$) whereas in 10% titres decrease constantly ($P<0.05$). Incubation time also reduced the titres of archaea ($P<0.01$). However, hydrogenotrophic population maintained titres along incubation period and increased with Co-i ($P<0.05$). Most of the archaeal DGGE bands were observed in all samples, indicating a common bacterial population origin and their structure showed that incubation time and Co-i can modify the clustering pattern.

Keywords: Pig slurry, archaea, hydrogenotrophic methanogens

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE *Bacillus cereus* var. Toyoi PARA MODIFICAR LA INVASIVIDAD DE *Escherichia coli* K88 y *Salmonella* Typhimurium EN CELULAS IPEC-J2

González-Ortiz¹, G., Cerdà-Cuéllar^{2,3}, M., Castillo⁴, M., Solà-Oriol¹, D. y Martín-Orúe¹, S.M.
¹Servei de Nutrició i Benestar Animal (SNiBA). Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Barcelona. ²Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus UAB, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain. ³Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain. ⁴Rubinum S.A. Av. de la Llana 123, 08191 Rubí, Barcelona. gemma.gonzalez@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes han demostrado la capacidad de comunicación de las bacterias mediante la producción de señales químicas también conocidas como *autoinductores* (AIs). Los AIs se secretan al medio durante el crecimiento bacteriano y, una vez alcanzado un nivel de concentración crítico, éstos pueden activar o reprimir la expresión de determinados factores de virulencia. Todo este proceso se conoce como *quorum sensing* (QS) (Nealson et al., 1970). Las acil-homoserina lactonas (AHL) son las primeras señales de QS usadas por bacterias gram negativas. Algunas enterobacterias de los géneros *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, no sintetizan AHL pero sí son capaces de reconocer las producidas por otras bacterias mediante la presencia de receptores de membrana (Nesse et al., 2011). Algunos probióticos podrían interferir de forma positiva con estos mecanismos. En este sentido, *Bacillus cereus* var. Toyoi ha demostrado capacidad de degradar las AHL producidas por otras bacterias (Castillo y Cerdà-Cuéllar, 2010). La hipótesis de este trabajo consideraría que la adición de la cepa probiótica *Bacillus cereus* var. Toyoi en la dieta de un lechón sano podría prevenir la expresión de factores de virulencia por parte de *E. coli* K88 y *Salmonella* Typhimurium (dos de los patógenos más relevantes en producción porcina) interfiriendo en los mecanismos de QS. En concreto, el objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad de la digesta procedente de lechones suplementados con *Bacillus cereus* var. Toyoi de modificar la invasividad de *E. coli* K88 y *S. Typhimurium* sobre un cultivo celular de epitelio intestinal porcino (IPEC-J2).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 32 lechones machos destetados (28 días de edad; peso vivo = 7,4 ± 0,02 kg) ([Large White x Landrace] x Duroc) los cuales fueron distribuidos en 16 corrales (2 animales por corral) y asignados a dos grupos experimentales: grupo control (CTR) y grupo probiótico (TOY). Los animales se alimentaron durante dos semanas con una dieta *pre-starter* y durante tres semanas más con una dieta *starter* sin ningún tipo de aditivo. Ambas dietas del grupo TOY, se suplementaron con *Bacillus cereus* var. Toyoi (10⁹ UFC/ g). Tras 34 días de consumo, los animales se sacrificaron para la obtención del contenido digestivo ileal. Se combinó el contenido ileal de los dos animales de cada corral y se sometió a dos fases de centrifugación a 45.000 x g para separar la fracción acuosa del material sólido y mucoso. El sobrenadante obtenido se esterilizó mediante filtración a través de 0,2 µm de diámetro de poro (VWR® Vacuum Filtration Systems, PES Membrane, Sterile).

Se emplearon dos cepas distintas de *E. coli*. La primera fue una cepa fimbrada (*E. coli* K88) aislada a partir de un brote de colibacilosis en España (FV12048) del serotipo (O149:K91:H10 [K-88]/LT-I/STb) y proporcionada por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* de Lugo y la segunda cepa fue aislada de un lechón destetado sano, caracterizada por no poseer fimbras (*E. coli* SF; F4 -, F6 -, F18 -, LT1 -, ST1 -, ST2 +, Stx2e -) cedida por la Dra. Calvo del Departamento de Sanidad y Anatomía Animal de la UAB; adicionalmente se utilizaron dos cepas de *S. Typhimurium* (7G9 y 9E9) aisladas de cerdo a partir de dos casos clínicos y cedidas por el Dr. Mateu del Departamento de Sanidad y Anatomía Animal de la UAB. Las dos cepas de *Salmonella* se escogieron a partir de una selección de entre 27 cepas por su respuesta invasiva en nuestro modelo de estudio, siendo la cepa 7G9 la más invasiva y la cepa 9E9 la menos invasiva. Todas las bacterias se cultivaron durante 24 h en Caldo Luria (CL) a 37°C con agitación. La ausencia de un posible efecto bactericida de los

sobrenadantes ileales en el crecimiento de de las bacterias se confirmó mediante cultivos puros.

Previamente a las pruebas de invasividad, se realizó una co-incubación a 37°C con agitación con 2 ml de contenido ileal de cada sobrenadante, 2 ml de CL y 4 µl del cultivo bacteriano (*E. coli* o *Salmonella*). A las 24 h, los co-incubados se centrifugaron a 1.700 x g durante 5 min y los *pellets* se resuspendieron con PBS hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 1 (λ = 650 nm). Éstos se diluyeron 100 veces para alcanzar una concentración aproximada de 6 log UFC/ml. En el mismo ensayo de co-incubación se incluyeron tres medios como controles en los que en lugar de añadir el filtrado ileal se añadió: CL, PBS, o bien el sobrenadante estéril del cultivo de *Bacillus cereus* var. Toyoi en medio CL (SN Toyo).

Las células epiteliales de intestino porcino (IPEC-J2) (re-suspendidas en medio Dulbecco's modificado) se sembraron (2×10^5 células por pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific) y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Una vez confirmada la presencia de la monocapa de células, los pocillos se lavaron con PBS y se añadieron 200 µL de medio CO₂ independiente (GIBCO®). Las placas se mantuvieron a 37°C durante 24 h hasta la realización del test de invasividad.

En las pruebas de invasividad, tras retirar el medio CO₂ independiente de los pocillos, se añadieron 200 µl de la suspensión de bacterias previamente co-incubadas con los contenidos ileales o con los controles. Durante un periodo de 30 minutos a 37°C, las bacterias se dejaron interactuar con el epitelio intestinal y tras lavar una vez los pocillos una vez con PBS estéril se añadieron 200 µl medio CO₂ independiente, incubando las placas a 37 °C para permitir el crecimiento de las bacterias adheridas a las células. El crecimiento bacteriano se monitorizó mediante DO a una longitud de onda de 650 nm cada 20 minutos (SPECTRA max 384 Plus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA). Los datos de DO se procesaron usando el procedimiento PROC NLIN, para modelos de regresión no lineal, del programa SAS (SAS®, 2002) y los parámetros obtenidos se usaron para calcular el $t_{DO=0,05}$ (tiempo (h) en el que las bacterias alcanzan una DO de 0,05 a 650 nm). Finalmente, se realizó un test ANOVA de los valores de $t_{DO=0,05}$ usando los procedimientos GLM (controles) y MIXED (contenidos ileales) de SAS. Todos los resultados se obtuvieron a partir de dos ensayos independientes con triplicados para cada determinación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la interpretación de los resultados, valores de $t_{DO=0,05}$ superiores al control indican una atenuación de la capacidad de adhesión e invasión de la bacteria. Considerando las dos cepas de *E. coli* co-incubadas con los controles, se observó un efecto significativo ($P = 0,01$) sobre la respuesta de invasividad. En general, las dos cepas co-incubadas con el sobrenadante estéril de un cultivo de *Bacillus cereus* var. Toyoi (SN Toyo) presentaron una menor capacidad de invasión respecto al CL (2,51 vs. 2,84 h; $P = 0,005$) sin que hubiera diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ambas cepas. La co-incubación de las cepas de *Salmonella* con SN Toyo no modificó la virulencia en comparación con CL (2,83 vs. 3,06; $P = 0,77$). En cuanto a la comparación entre las dos dietas experimentales, se observó una tendencia estadísticamente significativa ($P = 0,06$) sobre la reducción de la invasividad de las cepas de *E. coli* co-incubadas con los contenidos de íleon de los animales que recibieron el probiótico respecto a los controles (2,90 vs. 2,63 h). Es interesante destacar que aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento entre ambas cepas (P interacción = 0,36), dicha reducción fue de mayor magnitud en *E. coli* K88, en comparación con *E. coli* SF. En el caso de *Salmonella*, a pesar de observar diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas ($P < 0,0001$), que reflejan su diferente comportamiento invasivo, el tratamiento experimental no modificó su capacidad de invasión respecto al grupo CTR ($P = 0,89$).

Estos resultados demuestran la capacidad del sobrenadante ileal, de los animales que recibieron el probiótico, en modular la respuesta de invasión de *E. coli*, sin embargo no se observó ningún efecto sobre la invasión de *Salmonella* en nuestro modelo de estudio. Los

resultados obtenidos sugieren que la suplementación con *Bacillus cereus* var. Toyoi podría ser capaz de reducir la invasividad de *E. coli* al epitelio intestinal mediante la regulación en la expresión de factores de virulencia en el medio digestivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

●Castillo Gómez, M., Cerdà-Cuellar, M. 2010. ISCPP 2010 Kosice, Slovakia. Proceedings, 83-84. ● Neelson, K. H., Platt, T., Hastings, J.W. 1970. J. Bacteriol. 104:313-322. ● Nesse, L. L., Berg, K., Vestby, L. K., Olsaker, I., Djønne, B. 2011. Acta Vet. Scand. 53:44.

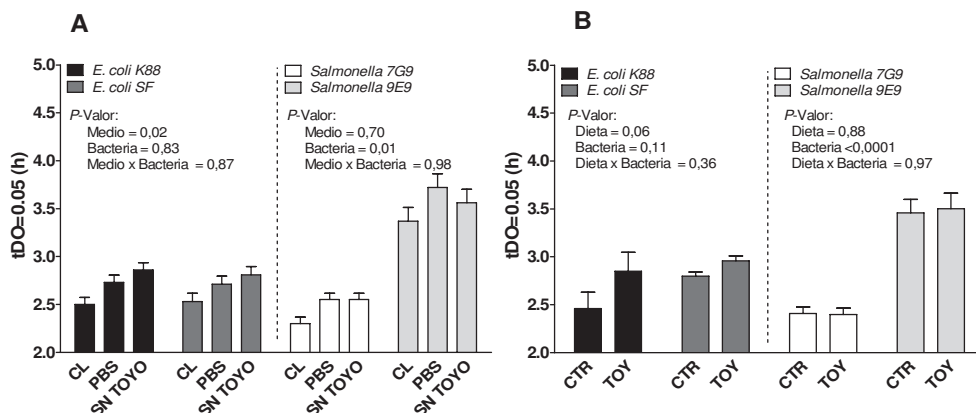


Figura 1. Invasión sobre células epiteliales intestinales porcinas (IPEC-J2) por parte de las bacterias previamente co-incubadas con diferentes medios control: CL (caldo luria), PBS (buffer salino fosfato), SN Toyo (sobrenadante estéril de un cultivo de *Bacillus cereus* var. toyoi) [A] y con los sobrenadantes ileales estériles de los grupos experimentales CTR (grupo control) y TOY (grupo probiótico) [B]. Las barras representan el error estándar de cada media. Valores de $t_{DO=0,05}$ (h) por encima del control CL, indican una menor capacidad invasiva de la bacteria. Se evaluó la invasividad de dos cepas de *E. coli* (con fimbrias (K88) o sin fimbrias (SF)) y dos cepas de *S. Typhimurium* (de alta invasividad (7G9) o baja invasividad (9E9)).

EVALUATION OF THE ABILITY OF *Bacillus cereus* var. Toyoi TO MODIFY THE INVASIVENESS OF *Escherichia coli* K88 AND *Salmonella* Typhimurium IN IPEC-J2 CELLS

ABSTRACT: The potential of the probiotic *Bacillus cereus* var. Toyoi, to modify the intestinal invasiveness of *Escherichia coli* K88 and *Salmonella* Typhimurium was tested on an *in vitro* model with IPEC-J2 cells. For that purpose a total of 32 weaning piglets allocated into 16 pens were fed two experimental diets added or not with *Bacillus cereus* var. Toyoi (10^9 UFC/g). After 34 days consuming the diets, animals were euthanized and ileal content pooled by pen and sterile supernatants obtained by centrifugation and filtration. Co-incubation of different strains of *E. coli* and *S. Typhimurium* with the sterile ileal supernatants showed a significant reduction in the invasiveness of *E. coli* to IPEC-J2 cells ($P= 0.01$) for the animals that received the probiotic, without significant differences between strains. The two strains of *Salmonella* showed differences in their invasiveness to cells ($P< 0.0001$) but no differences related to experimental treatments. These results suggest the ability of *Bacillus cereus* var. Toyoi to interfere with quorum sensing mechanisms of *E. coli* in the ileum of pigs, probably repressing the expression of some virulence factors involved in the adhesion and invasion of epithelial cells.

Keywords: *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, IPEC-J2

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN LACTOBACILOS AISLADOS DE JABALÍES.

Barrios, V¹., Carvajal, A., Miranda, R., Estrada, O., Argüello H., García, M., Naharro, G. Rubio, P.

Universidad de León (ULE). Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Campus de Vegazana, S/N CP 24071. vladimirbarrios2009@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación ha constatado que en un porcentaje muy elevado de bacterias del ácido láctico aisladas en cerdos domésticos de granjas de producción convencionales, presentan resistencia a los antibióticos (Barrios et al., 2012). Por ello, tratamos de determinar la sensibilidad a los antibióticos del mismo tipo de bacterias aisladas de jabalíes no expuestos a la contaminación farmacológica por causas humanas con el fin de obtener lactobacilos fenotípicamente sensibles a los antibióticos y libres de genes de resistencia. El objetivo del presente trabajo fue identificar y evaluar los niveles de resistencia a los principales antibióticos de lactobacilos provenientes del tracto gastrointestinal y las heces de jabalíes. A continuación se exponen algunos resultados preliminares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon tres hembras adultas (>70 kg) y dos crías (8-10 kg) provenientes de Zamora (Castilla y León), y tres ejemplares (30-70 kg) provenientes de Tornavaca (Extremadura). Las cepas aisladas se seleccionaron primero por pruebas de tolerancia a la barrera gástrica y posteriormente se identificaron mediante la amplificación y secuenciación de la región intergénica 16S/23S del ARN ribosómico (Berthier y Ehrlich, 1998).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a la ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol según los estándares del CLSI y siguiendo el protocolo de susceptibilidad para lactobacilos descrito por Klareet al. (2005). Se emplearon los criterios establecidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012) para los puntos de corte de cada uno de los antibióticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación por PCR de las cepas seleccionadas dio los resultados que se indican a continuación. Los géneros firmemente adheridos a mucosa fueron *Lactobacillus* (92%), *Pediococcus* (2%) y *Bifidobacterium* (6%). Las especies aisladas en el contenido intestinal, heces y mucosa incluyeron *Lactobacillus fermentum* (12%), *Lactobacillus mucosae* (48%), *Lactobacillus reuteri* (12%), *Lactobacillus* sp. cepa NGRI (2%), *Lactobacillus animalis* (12%), *Lactobacillus plantarum* (2%), *Lactobacillus murinus* (4%), *Bifidobacterium bifidum* (6%) y *Pediococcus pentosaceus* (6%).

Durante la determinación de las CMI solo 9 cepas (18%) no presentaron ningún tipo de resistencia a los antibióticos (Tabla 1). Otras 19 cepas presentaban un nivel de resistencia en algunos antibióticos, solo una dilución más a la establecida, las cuales consideramos como de moderado a leve (38%), mientras que 22 aislados (44%) presentaba rangos muy elevados de resistencia y/o multiresistencia.

En conclusión, a partir de muestras de jabalíes salvajes es posible obtener cepas de bacterias del ácido láctico libres de resistencia a los antimicrobianos. Sin embargo, se detecta un cierto nivel de resistencia a los antibióticos en estas bacterias lácticas, que pudiera tener su origen en la contaminación de los animales silvestres por actividades agroganaderas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barrios G. V., Carvajal, A., P. Rubio (2012) Rev. Crianza y Salud. 43: 34 - 43. • Berthier, F., Ehrlich S., 1998. FEMS Microbiology Letters 161. 97-106. • EFSA, 2012. Scientific Opinion. EFSA Journal. 10(6):2740. • Klare, I., Konstabel, C., Muller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H., Witte, W., 2005. Applied and Environmental Microbiology. 71, 12: 8982–8986.

Agradecimientos: Agencia Española de Cooperación Internacional MAEC – AECID

Tabla 1 Bacterias del ácido láctico sensibles a los antibióticos, adheridas y aisladas de la mucosa intestinal, contenido, y heces de jabalíes salvajes.

	CMI ₍₁₀₀₎ mg / L								
	A	Cli	Es	Er	G	K	T	V	Clo
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,125	0,125	2	0,125	0,5	16	4	0,125	4
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	0,5	0,25	0,125	2	4	0,125	4
<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI	1	0,25	1	0,125	0,125	2	2	0,5	2
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,25	0,125	1	0,125	0,125	2	8	16	4
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,125	2	2	0,125	4
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	2	0,125	0,5	8	4	0,125	2
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,25	2	4	0,250	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,25	2	4	0,250	4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,25	2	4	0,250	4
Media CMI ₍₁₀₀₎	0,24	0,14	1,17	0,14	0,25	4,22	4,00	1,97	3,56

A: ampicilina, **Cli:** clindamicina, **Es:** estreptomycin, **Er:** eritromicina,

G: gentamicina, **K:** kanamicina, **T:** tetraciclina, **V:** vancomicina, **Clo:** cloranfenicol

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF VETERINARY IMPORTANCE, IN LACTOBACILLI ISOLATED FROM WILD BOARS

ABSTRACT: We isolated strains of lactic acid bacteria of the intestinal mucosa and feces of pigs of different ages, group 1: two young (8-10 kg) and three adult females weighing more than 70 kg, group 2: three adults 30 - 70 kg. The species of lactic acid bacteria isolated from the intestinal contents, and mucous stools were, *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. mucosae*, *L. reuteri*, *L. NGRI*, *L. animalis*, *L. plantarum* and *L. murinus*), *Bifidobacterium bifidum* and *Pediococcus pentosaceus*. We detected high levels of resistance and multiresistance to antibiotics in 44% of the strains. Upgraded to a higher stage of selection only 9 to 18% strains of bacteria sensitive to antibiotics. We show that it is possible to get strains free antimicrobial resistance detected in wild boar and a level of antibiotic resistance very high in lactic bacteria, which may be caused by human pollution.

Keywords: *Lactobacillus*, Mucous, Wild Boars, Isolation, Antimicrobial susceptibility

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN LACTOBACILOS AISLADOS DE JABALÍES.

Barrios, V¹., Carvajal, A., Miranda, R., Estrada, O., Argüello H., García, M., Naharro, G. Rubio, P.

Universidad de León (ULE). Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Campus de Vegazana, S/N CP 24071.vladimirbarrios2009@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación ha constatado que en un porcentaje muy elevado de bacterias del ácido láctico aisladas en cerdos domésticos de granjas de producción convencionales, presentan resistencia a los antibióticos (Barrios et al., 2012). Por ello, tratamos de determinar la sensibilidad a los antibióticos del mismo tipo de bacterias aisladas de jabalíes no expuestos a la contaminación farmacológica por causas humanas con el fin de obtener lactobacilos fenotípicamente sensibles a los antibióticos y libres de genes de resistencia. El objetivo del presente trabajo fue identificar y evaluar los niveles de resistencia a los principales antibióticos de lactobacilos provenientes del tracto gastrointestinal y las heces de jabalíes. A continuación se exponen algunos resultados preliminares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon tres hembras adultas (>70 kg) y dos crías (8-10kg) provenientes de Zamora (Castilla y León), y tres ejemplares (30-70 kg) provenientes de Tornavaca (Extremadura). Las cepas aisladas se seleccionaron primero por pruebas de tolerancia a la barrera gástrica y posteriormente se identificaron mediante la amplificación y secuenciación de la región intergénica 16S/23S del ARN ribosómico (Berthier y Ehrlich, 1998).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a la ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol según los estándares del CLSI y siguiendo el protocolo de susceptibilidad para lactobacilos descrito por Klareet *al.* (2005). Se emplearon los criterios establecidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012) para los puntos de corte de cada uno de los antibióticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación por PCR de las cepas seleccionadas dio los resultados que se indican a continuación. Los géneros firmemente adheridos a mucosa fueron *Lactobacillus* (92%), *Pediococcus* (2%) y *Bifidobacterium* (6%). Las especies aisladas en el contenido intestinal, heces y mucosa incluyeron *Lactobacillus fermentum* (12%), *Lactobacillus mucosae* (48%), *Lactobacillus reuteri* (12%), *Lactobacillus* sp. cepa NGRI (2%), *Lactobacillus animalis* (12%), *Lactobacillus plantarum* (2%), *Lactobacillus murinus* (4%), *Bifidobacterium bifidum* (6%) y *Pediococcus pentosaceus* (6%).

Durante la determinación de las CMI solo 9 cepas (18%) no presentaron ningún tipo de resistencia a los antibióticos (Tabla 1). Otras 19 cepas presentaban un nivel de resistencia en algunos antibióticos, solo una dilución más a la establecida, las cuales consideramos como de moderado a leve (38%), mientras que 22 aislados (44%) presentaban rangos muy elevados de resistencia y/o multiresistencia.

En conclusión, a partir de muestras de jabalíes salvajes es posible obtener cepas de bacterias del ácido láctico libres de resistencia a los antimicrobianos. Sin embargo, se detecta un cierto nivel de resistencia a los antibióticos en estas bacterias lácticas, que pudiera tener su origen en la contaminación de los animales silvestres por actividades agroganaderas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barrios G. V., Carvajal, A., P. Rubio (2012) Rev. Crianza y Salud. 43: 34 - 43. • Berthier, F., Ehrlich S., 1998. FEMS Microbiology Letters 161. 97-106. • EFSA, 2012. Scientific Opinion. EFSA Journal. 10(6):2740. • Klare, I., Konstabel, C., Muller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H., Witte, W., 2005. Applied and Environmental Microbiology. 71, 12: 8982–8986.

Agradecimientos: Agencia Española de Cooperación Internacional MAEC – AECID

Tabla 1 Bacterias del ácido láctico sensibles a los antibióticos, adheridas y aisladas de la mucosa intestinal, contenido, y heces de jabalíes salvajes.

	CMI ₍₁₀₀₎ mg / L								
	A	Cli	Es	Er	G	K	T	V	Clo
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,125	0,125	2	0,125	0,5	16	4	0,125	4
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	0,5	0,25	0,125	2	4	0,125	4
<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI	1	0,25	1	0,125	0,125	2	2	0,5	2
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,25	0,125	1	0,125	0,125	2	8	16	4
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,125	2	2	0,125	4
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	2	0,125	0,5	8	4	0,125	2
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,25	2	4	0,250	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,25	2	4	0,250	4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,125	0,125	1	0,125	0,25	2	4	0,250	4
Media CMI ₍₁₀₀₎	0,24	0,14	1,17	0,14	0,25	4,22	4,00	1,97	3,56

A: ampicilina, **Cli:** clindamicina, **Es:** estreptomicina, **Er:** eritromicina,

G: gentamicina, **K:** kanamicina, **T:** tetraciclina, **V:** vancomicina, **Clo:** cloranfenicol

DETERMINATION ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF VETERINARY IMPORTANCE, IN LACTOBACILLI ISOLATED FROM WILD BOARS

ABSTRACT: We isolated strains of lactic acid bacteria of the intestinal mucosa and feces of pigs of different ages, group 1: two young (8-10 kg) and three adult females weighing more than 70 kg, group 2: three adults 30 - 70 kg. The species of lactic acid bacteria isolated from the intestinal contents, and mucous stools were, *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. mucosae*, *L. reuteri*, *L. NGRI*, *L. animalis*, *L. plantarum* and *L. murinus*), *Bifidobacterium bifidum* and *Pediococcus pentosaceus*. We detected high levels of resistance and multiresistance to antibiotics in 44% of the strains. Upgraded to a higher stage of selection only 9 to 18% strains of bacteria sensitive to antibiotics. We show that it is possible to get strains free antimicrobial resistance detected in wild boar and a level of antibiotic resistance very high in lactic bacteria, which may be caused by human pollution.

Keywords: *Lactobacillus*, Mucous, Wild Boars, Isolation, Antimicrobial susceptibility

RECUESTO MICROBIANO EN HECES DE LECHONES A DÍA 5 Y 19 TRAS EL DESTETE EN CONDICIONES DE PRODUCCIÓN INDUSTRIAL.

Diago.S.¹, Letosa.J.³, Fernández.C.¹, Letosa.A.², Benito.A.², Bríngola.B.²

¹Servicio técnico porcino INZAR,S.L ²Servicio técnico laboratorio INZAR,S.L.

³ Servicio técnico porcino y departamento de Nutrición, INZAR,S.L.

INZAR,S.L. C/Julio García Condoy, 42. ZARAGOZA,
sdiago@inzar.net

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que pueden tener una repercusión importante sobre los rendimientos zootécnicos en la fase de transición correspondiente al crecimiento de los lechones entre los 6 Kg y los 20 Kg es una correcta adaptación en el momento del destete de los animales. En esta fase suelen diagnosticarse problemas digestivos asociados, entre otros factores, a las condiciones de las instalaciones, higiene, alimentación, manejo, etc. Por ello es de interés un mejor conocimiento de los acontecimientos que ocurren en la flora microbiana del lechón en esta fase y como pueden modificarse buscando un mejor rendimiento productivo y una disminución de las problemáticas digestivas asociadas a este periodo de la vida del lechón.

En este estudio se pretende hacer una medición de algunas poblaciones bacterianas en heces mediante técnicas laboratoriales sencillas y poderlas emplear de manera rutinaria para la mejora de los rendimientos zootécnicos en la fase de transición en lechones producidos en granjas industriales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se dispuso de 190 lechones de genética Landrace*Large White destetados con 21 días de edad y 5,5 kg de peso en una granja industrial ubicada en la población de San Mateo de Gállego, (Zaragoza). Los animales en el momento del destete fueron trasladados a unas instalaciones adecuadas con ambiente controlado. Se alojaron en cuadras en grupos de 30 con una tolva de cinco bocas y dos bebederos de cazoleta.

De la población inicial se escogieron al azar 19 lechones de distintas cuadras y se identificaron individualmente con un crotal numerado. Los animales se pesaron individualmente a Día 5 y a Día 19. Se obtuvo una muestra de heces a Día 5 y Día 19 y se cultivó empleando técnicas microbiológicas tradicionales.

En laboratorio se pesó 1 gramo de heces en condiciones estériles y se efectuó un banco de diluciones hasta 10^{-6} en solución salina fisiológica estéril. Se sembró un inóculo de 0,1 ml de dilución (10^{-2}) y (10^{-6}) de cada una de las muestras en placa de los medios: Agar McConkey para la cuantificación de bacterias *Enterobacteriaceae* lactosa positivas, (*Escherichia*, *Enterobacter*, *klebsiella*, *Citrobacter*), Agar EMB (Eosin Methylene Blue) para contabilizar *Escherichia coli*, MRS de Man Rogosa, para bacterias ácido lácticas (BAL), Columbia + 5% sangre de carnero para *Streptococcus spp*, y otras bacterias aerobias no contabilizadas en grupos anteriores principalmente *Bacillus spp* y bacterias anaerobias sin incluir *Clostridium*. El inóculo se extendió con asa de Drigalsky estéril, tras flamear con alcohol, por toda la superficie de la placa de medio de cultivo. Una placa de Agar Columbia +5% sangre de carnero se incubó en jarra de anaerobiosis durante 48 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las placas de MRS de Man Rogosa, se incuban en atmósfera micro aerobia 48 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El resto de las placas, Agar columbia +5% sangre de carnero, Agar McConkey y Agar EMB se incubaron en aerobiosis a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Se leyeron las placas a 24 y 48 horas, y se cuantificó el número de bacterias compatibles con las buscadas, en cada uno de los medios selectivos, multiplicando por el factor de dilución. Los datos se recogieron en una hoja de cálculo y se analizaron estadísticamente con una prueba t-student de dos colas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo del periodo de destete, los animales registraron 0,274 Kg/d de consumo medio diario, 0,237 Kg/d de crecimiento medio diario y un índice de conversión de 1,15. En la Tabla

1 registramos los crecimientos individuales de los 19 lechones escogidos al azar, obteniéndose un crecimiento medio diario de 0,260 Kg/día.

En la Tabla 2 se recogen los recuentos microbiológicos en heces para las distintas poblaciones bacterianas analizadas. En la toma del día 5 tras el destete apreciamos una mayor representación de poblaciones anaerobias (8,2 log 10) y bacterias ácido lácticas (8,2 log10) y una menor representación de *Enterobacteriaceae lactosa +* y *Escherichia coli*, (5,9 log10 para ambos tipos). A los 19 días tras el destete se aprecia un mayor incremento en las poblaciones de *Enterobacteriaceae lactosa +* y *Escherichia coli* que en el resto de grupos, con un incremento superior al de una unidad logarítmica, siendo inferior a 0,5 unidades en los grupos de bacterias acidolácticas. No se observa variación significativa en los grupos de bacterias anaerobias, *Streptococcus* y otros aerobios. Al analizar las correlaciones entre la variación logarítmica de las poblaciones bacterianas y el crecimiento individual de los lechones apreciamos una relación inversa (Tabla 3) con unas R² de 0,427 y 0,271 para las variaciones en las poblaciones de *Enterobacteriaceae lactosa +* y *Escherichia coli* entre los días 5 y 19. Para el resto de poblaciones estudiadas no detectamos correlación entre su variación y el crecimiento de los lechones. Si hacemos una comparación entre los individuos de mayor ganancia media diaria (9 animales, 0,296 Kg/d) en el intervalo con los de menor ganancia media diaria (10 animales, 0,229 Kg/d), apreciamos (Tabla 4) en el grupo de mayor crecimiento que a día 19 se obtienen menor U.F.C. por gramo de heces para las poblaciones de *Enterobacteriaceae lactosa +*, *Escherichia coli* y el sumatorio de bacterias cultivadas. No se aprecian diferencias relacionadas con el grupo de bacterias acidolácticas pero si se observa un mayor ratio Bacterias acidolácticas/*E.coli* en el grupo de mayor ganancia media diaria, 1,7 veces frente a 1,1 en el grupo de menor crecimiento a día 19 tras el destete.

Podemos concluir que mediante métodos microbiológicos tradicionales detectamos parte de los cambios que se producen en las poblaciones microbiológicas en las heces del lechón en la fase post destete y apreciamos su impacto sobre el crecimiento individual de los animales alojados en condiciones industriales de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Manuel Fondevila Camps, Adaptación al destete de la población microbiana del tracto digestivo, Suis, ISSN 1699-7867, N°48, 2008.

Tabla 1. Resultados de crecimiento individuales de los lechones

Nº D5	Nº D19	P.M.D5 (Kg)	SD	PM D19 (Kg)	SD	GMD (Kg/d)	SD
19	19	6,36	0,85	10,01	1,16	0,260	0,04

Tabla 2. Recuentos microbianos (ufc logaritmo base 10 por gramo de heces)

	UFC D5	SD D5	UFC D19	SD D19	Diferencia U.F.C.	SD	Valor p t-student
<i>Enterobacteriaceae lactosa +</i>	5,9	1,9	7,4	1,7	1,42	2,68	0,017
<i>Escherichia coli</i>	5,9	1,8	7,0	1,9	1,02	2,70	0,088
BAL	8,2	0,6	8,7	0,8	0,49	1,06	0,033
<i>Streptococcus</i>	7,3	1,7	7,0	2,6	-0,25	2,75	0,709
Otros Aerobios	6,6	0,9	6,3	1,7	-0,21	1,61	0,627
Bacterias Anaerobias	8,2	1,4	8,6	0,6	0,34	1,48	0,297
Suma Bacterias cultivadas	8,8	0,4	9,4	0,5	0,51	0,64	0,001

Suma bacterias cultivadas resulta de la suma de los grupos: *Enterobacteriaceae lactosa+*, bacterias acidolácticas, otros aerobios y bacterias anaerobias. BAL: Bacterias acidolácticas.

Tabla 3. Correlación entre variación en los recuentos microbianos (ufc logaritmo base 10 por gramo de heces) y el crecimiento individual en los lechones entre el día 5 y 19 tras el destete

	<i>Enterobacteriaceae lactosa +</i>	<i>E. coli</i>	BAL	<i>Streptococcus</i>	Otros Aerobios	Bacterias Anaerobias	Sum. bacterias cultivadas
R ²	0,427	0,271	0,078	0,002	0,079	0,069	0,386
Valor p (t-student)	0,003	0,008	0,250	0,858	0,245	0,278	0,005

Tabla 4. Diferencias en recuentos microbianos en heces (U.F.C. log10/gramo) a día 5 y 19 tras el destete entre los animales de menor y mayor ganancia media diaria en este intervalo.

	G.M.D. Menores	S.D.	G.M.D. Mayores	S.D.	Valor p (t-student)
N	10		9		
<i>g.m.d. d5 a d19 (Kg/día)</i>	0,229	0,02	0,296	0,02	0,000
<i>Peso d5 (Kg)</i>	6,1	0,9	6,7	0,6	0,121
<i>Peso d19 (Kg)</i>	9,3	1,1	10,8	0,5	0,001
<i>Enterobacteriaceae lactosa + d5</i>	5,7	2,0	6,1	2,0	0,617
<i>Enterobacteriaceae lactosa + d19</i>	8,4	1,3	6,3	1,6	0,005
<i>Escherichia coli d5</i>	5,9	1,8	6,0	1,9	0,860
<i>Escherichia coli d19</i>	8,2	1,2	5,7	1,9	0,003
<i>Bacterias acidolácticas d5</i>	8,1	0,7	8,4	0,3	0,312
<i>Bacterias acidolácticas d19</i>	8,9	0,8	8,6	0,9	0,378
<i>Sum. bacterias cultivadas d5</i>	8,7	0,3	8,9	0,5	0,296
<i>Sum. bacterias cultivadas d19</i>	9,6	0,4	9,1	0,5	0,033
<i>Ratio BAL/E.coli d5</i>	1,5	0,6	1,6	0,6	0,940
<i>Ratio BAL/E.coli d19</i>	1,1	0,2	1,7	0,6	0,024

BACTERIAL COUNTS IN FAECES FROM PIGLETS FROM 5 TO 19 AFTER WEANING ON INDUSTRIAL PRODUCTION CONDITIONS.

ABSTRACT: Microbial counts were performed on faeces from piglets in intensive production conditions, in order to check the adaptation of microbial digesta to weaning. Piglets were weaned at 21 days of life, and samples were taken 5 and 19 days after weaning. Lactose positive enterobacteria, *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, *Streptococcus* and anaerobic bacteria were counted by conventional culture techniques that were proven to be effective in monitoring postweaning microbiological changes in pigs.

Keywords: piglets, faeces, growth, *Escherichia coli*.

EFFECTO DE LA ADICIÓN EN EL PIENSO DE MANANOLIGOSACÁRIDOS Y β -GLUCANOS DE LEVADURAS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE GAZAPOS

El Abed, N.¹, Badiola, I.², Trocino, A.³, Tazzoli, M.⁴, Majolini, D.⁴, Pérez de Rozas, A.², Combes, S.⁵, Cauquil, L.⁵, Acosta, N.⁶, Heras, A.⁶, Menoyo, D.¹, García, J.¹, Xiccató, G.⁴, Carabaño, R.^{1*}

¹Departamento de Producción Animal, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. ²CReSa (UAB-IRTA), Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain. ³Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy. ⁴Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animal and Environment (DAFNAE), University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy. ⁵INRA, UMR1289 TANDEM, Chemin de Borde Rouge, 31326 CastanetTolosan France. ⁶Instituto de Estudios Biofuncionales. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

*rosa.carabano@upm.es

INTRODUCCIÓN

Algunos prebióticos como los mananoligosacáridos (MOS) y los β -glucanos extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* han mostrado efectos beneficiosos sobre la modulación de la microbiota intestinal en pollos (Yang et al., 2008) y en cerdos (Castillo et al., 2007). De hecho, la suplementación de la dieta con MOS o β -glucanos reduce el número de enterobacterias a nivel del íleon y previene la infección por *E. coli* (ETEC) (Castillo et al., 2007) en lechones tras el destete. Los escasos trabajos en conejos, también muestran que la suplementación con MOS mejoran la integridad de la mucosa intestinal y protege contra patógenos comunes (Mourao et al., 2006; Guedes et al., 2009). Los trabajos realizados con técnicas moleculares muestran resultados contradictorios respecto a la capacidad de los productos derivados de la pared de levaduras sobre la modulación de la microbiota intestinal (El Abed et al., 2012; Kimsé et al., 2012). Por ello el objetivo de este trabajo fue profundizar en el estudio del efecto de la adición de MOS y de β -glucanos en piensos postdestete de conejos sobre la microbiota ileal y cecal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se formuló un pienso control (C) con un contenido en proteína bruta, fibra dietética total y FND de un 15, 40 y 33% respectivamente. Se fabricaron tres piensos adicionales mediante la suplementación del pienso control con 200 ppm de β -glucanos (extraído de *Saccharomyces cerevisiae* por el Instituto de Estudios Biofuncionales de la UCM; Pienso G2), 800 ppm de MOS (Actigen Alltech, España; Pienso M2), y una combinación de ambos (100 ppm de β -glucanos y 400 ppm de MOS; Pienso MG). Los piensos incluyeron como único medicamento el coccidiostato diclazuril (0,05%). Se utilizaron 64 gazapos destetados a 32 días de edad. Los animales fueron bloqueados por camada y asignados al azar a los 4 tratamientos y se alimentaron *ad libitum*. A los 45 días de edad los animales fueron sacrificados y se tomó muestras de 1g tanto del contenido cecal como del ileal y se analizaron utilizando la técnica TRFLP (Gómez Conde et al., 2007). Para el análisis de los resultados se utilizó el STATFINGERPRINTS versión 1.3 (Michelland et al., 2009) ejecutado en R versión 2.10. La proximidad de los perfiles de RFLP derivados de las comunidades bacterianas se evaluó mediante el cálculo de la matriz de similitud utilizando la distancia de Bray Curtis. Las matrices de distancia de la comunidad bacteriana se analizaron utilizando la escala no métrica multidimensional (nMDS). Las diferencias entre los grupos de los perfiles RFLP de la comunidad bacteriana se calcularon utilizando un análisis ANOSIM que calcula la similitud (R-ANOSIM) entre tratamientos y su probabilidad. El estadístico R varía desde 0 (poco separado) a 1 (bien separado).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se representa las distancias relativas entre todos los animales mediante un análisis nMDS, observándose que la suplementación en el pienso con MOS, β -glucanos, así

como la mezcla de ambos tuvieron efecto sobre las comunidades bacterianas tanto en íleon como en ciego (R-ANOSIM>0,35; P<0,001. Tabla 1). En ambos tramos digestivos, el pienso MG indujo el mayor cambio en la composición de la comunidad bacteriana en comparación con el pienso control (R= 0,95 a nivel ileal, R=0,69 a nivel cecal; P<0,001). La comunidad bacteriana de estos animales fue también diferente de aquellos animales que consumieron los piensos suplementados con β -glucanos (G2) o con MOS (M2) (Tabla 1). La comunidad bacteriana de los animales del tratamiento G2 es la que se encuentra más cercana al grupo control, sin embargo se llegan a detectar diferencias entre ambos tratamientos (P<0,001). La Figura 1 refleja que la variabilidad intra-grupos fue diferente entre los tratamientos tanto en íleon como en ciego. Mientras que la microbiota del pienso control fue la más homogénea, los animales del pienso MG mostraron la estructura bacteriana más heterogénea (P<0,05) tanto en íleon como en ciego. En íleon, el índice de biodiversidad (Simpson) indica que los animales de la dieta control tuvieron la estructura bacteriana más diversa (P=0,010. Tabla 2), en comparación con los animales que recibieron los piensos con aditivos. Mientras que a nivel cecal no hubo diferencia significativa en la biodiversidad bacteriana entre tratamientos. Estos datos sugieren que los cambios de la microbiota provocados por los aditivos han sido más importantes a nivel ileal que a nivel cecal. La menor diversidad observada en íleon en los 3 tratamientos con aditivos en comparación con el control podría indicar una selección de especies: el índice de Simpson disminuye cuando algunas especies vuelven a ser dominantes en la comunidad bacteriana. Concluyendo, los MOS y los β -glucanos, provocan cambios en la microbiota ileal y cecal de los gazapos tras el destete. La mezcla de ambos aditivos parece tener un efecto propio y diferente a sus componentes sobre la microbiota ileal y cecal. Por ello, sería necesario un estudio más específico sobre las poblaciones bacterianas más afectadas en estos cambios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Taylor-Pickard, J.A., Pérez J.F. & Gasa J. 2008. J. Anim. Sci. 86: 94- 101
- Guedes, C. M., Mourao, J. L., Silva, S. R., Gomes, M. J., Rodrigues, M. A. M. & Pinheiro, V. 2009 Anim. Feed Sci. Technol. 150: 330-336
- El Abed, N., Menoyo, D., García, J., Carabaño, R., Pérez de Rozas, A., Badiola, I., Eras, M.A., Tazzoli, M., Trocino, A., Majolini, D. & Xiccato, G. 2012. 10th W. Rabb. Cong. Egypt: 673-677
- Kimsé, A., Bayourthe, C., Monteils, V., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., Combes, S. & Gidenne T. 2012. Anim. Feed Sci. Technol. 173: 235-243
- Gómez-Conde, M.S., García, J., Chamorro, S., Eiras, P., Rebollar, P.G., Pérez de Rozas, A., Badiola, I., De Blas, C. & Carabaño, R. 2007. J. Anim. Sci. 85: 3313-3321
- Michelland, R. J., Dejean, S., Combes, S., Lamothe, L. & Cauquil, L. 2009. Mol. Ecol. Resour. 9: 1359-1363
- Mourao, J.L., Pinheiro, V., Alves, A., Guedes, C.M., Pinto, L., Saavedra, M.J., Spring, P. & Kocher A. 2006. Anim. Feed Sci. Technol. 126: 107-120
- Yang, Y., Iji, P. A., Kocher, A., Mikkelsen, L. L. & Choct, M. 2008 J. Anim. Phys. Anim. Nut. 92: 650-659.

Tabla 1. Valores de similitud (R-ANOSIM) entre los animales (16/tratamiento) de los distintos tratamientos a nivel ileal y cecal, obtenido a partir de las bandas de TRFLP

	C	G2	M2
Íleon			
G2	0,582***		
M2	0,848***	0,349***	
MG	0,951***	0,848***	0,586***
Ciego			
G2	0,441***		
M2	0,568***	0,636***	
MG	0,688***	0,606***	0,467***

C: pienso control sin aditivos. G2: pienso C con 200 mg de β -glucanos/kg. M2: pienso C con 800 mg de MOS/kg. MG: pienso C con 100 mg de β -glucanos+ 400 mg de MOS/kg.***:P<0,001

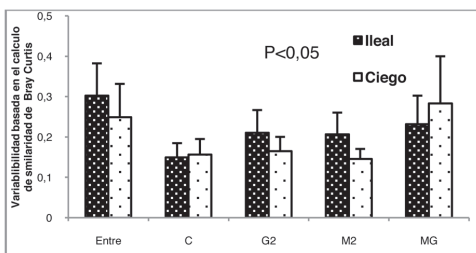


Figura 1. Efecto de la adición de MOS y β -glucanos sobre la variabilidad entre e intra grupos en conejos (16/tratamientos) a los 45 días de edad. (C: pienso control sin aditivos. G2: pienso C con 200 mg de β -glucanos/kg. M2: pienso C con 800 mg de MOS/kg. MG: pienso C con 100 mg de β -glucanos+ 400 mg de MOS/kg)

Tabla 2. Efecto de la adición de MOS y β -glucanos sobre el índice de Simpson en conejos de 45 días de edad

	C	G2	M2	MG	SEM	P valor
Íleon	4,69 ^a	4,24 ^b	4,32 ^b	4,39 ^b	0,095	0,010
Ciego	4,43	4,36	4,43	5,00	0,202	NS

C: pienso control sin aditivos. G2: pienso C con 200 mg de β -glucanos/kg. M2: pienso C con 800 mg de MOS/kg. MG: pienso C con 100 mg de β -glucanos+ 400 mg de MOS/kg. NS: P > 0.10.

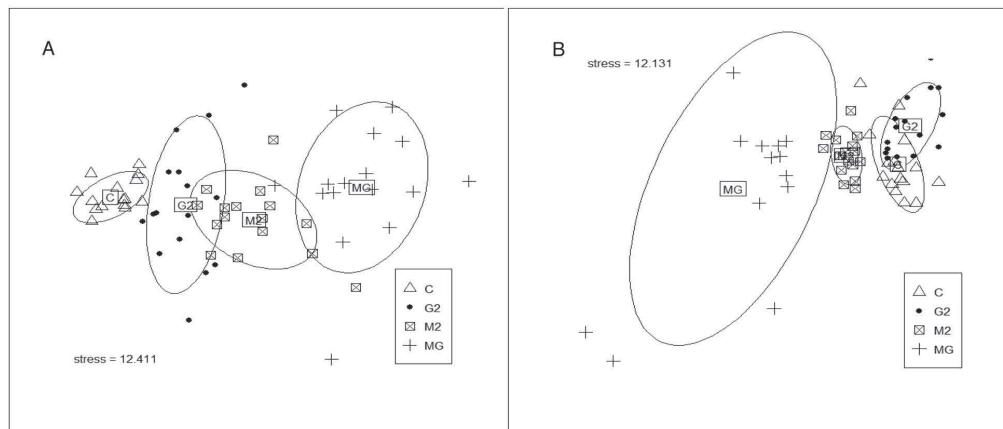


Figura 2. nMDS de las bandas de TRFLP de la comunidad bacteriana ileal (a) y cecal (b) de conejos de 45 días de edad alimentados con C (pienso sin aditivos), G2 (200 mg de β -glucanos/kg), M2 (800 mg de MOS/kg) y MG(100 mg de β -glucanos+ 400 mg de MOS/kg)

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT AGL2008-00627, una beca FPI del Ministerio de Educación y por la Comunidad de Madrid S2009/AGR-1704. Agradecemos al Sr. Roquet y a Alltech el suministro de Actigen[®].

EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH MANNANOLIGOSACCHARIDES AND β -GLUCANS ON INTESTINAL MICROBIOTA IN RABBITS AFTER WEANING

ABSTRACT: This work aimed to study the response of the ileal and caecal microbiota after dietary supplementation with MOS (Actigen, Alltech) and β -glucans. Sixty four weaning rabbits were randomly assigned to 4 experimental diets and fed ad libitum for 13 days as following: a control diet (C), G2 and M2 diets obtained supplementing C diet with 200 mg/kg of β -glucans or 800 mg /kg of MOS, respectively and MG diet was supplemented with 100 mg/kg of β -glucans + 400 mg/kg of MOS. The microbiota of ileum and caecum digesta was analyzed using TRFLP technique. Animals fed G2 and M2 decrease the biodiversity in ileum (P=0.010), but did not affect the biodiversity of the caecal microbiota. MG diet led to a microbiota distant from others diets both in ileum and caecum, especially from control group (R= 0.95, R=0.69 respectively; P<0.001). Similarity analysis and diversity calculation provided that microbiota changes caused by the additives have been most important in ileum than in caecum. In conclusion, the MOS and the β -glucans cause changes in ileal and caecal microbiota of young rabbits after weaning. The mixture of both seems to have a distant effect than the individual components.

Keywords: β -glucans, mannanoligosaccharides, microbiota, rabbits

EFFECTO DEL TIPO DE DESTETE EN CONEJAS MULTÍPARAS SOBRE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA EN EL CIEGO DE SUS GAZAPOS

Rodríguez-Romero, N.¹, Abecia, L.^{1,2}, Martínez-Vallespín, B.³, Fondevila, M.¹

¹ IUCA, Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. ² Instituto de Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada. ³ Instituto de Ciencia y Tecnología animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia.

mfondev@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una población microbiana estable y diversa en el tracto digestivo de los gazapos reduce la incidencia de procesos entéricos, especialmente ligados a situaciones de estrés, como es el caso del destete. El establecimiento de la comunidad microbiana cecal está determinado por la microbiota de la madre (Abecia et al., 2007), hasta el punto que el 50% de la mortalidad en granjas comerciales está ligada únicamente al 14% de las camadas (de Blas et al., 2012). Por otra parte, el manejo de la alimentación durante el destete modula la diversidad y estabilidad de la población cecal (Combes et al., 2011). Aparentemente, el retraso de la edad al destete disminuye la proliferación de patógenos y reduce la mortalidad en condiciones de producción (de Blas et al., 2012).

Este trabajo estudia las características de la población microbiana de conejos destetados a distintas edades, provenientes de conejas multíparas sometidas al mismo manejo, empleando cecotrofos como muestra representativa y seriada del ambiente cecal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon diez conejas multíparas en lactación, de raza Neozelandesa, recibiendo desde el parto una dieta comercial para reproductoras (Cunilactal-UPV), y sus camadas. Los animales se alojaron en una granja experimental con ambiente controlado. Las conejas provenían de grupos manejados durante 4 a 6 partos con destetes a los 28 días (D28, n=5) o a los 42 días (D42; n=5). Los gazapos tuvieron acceso a la ración de sus madres desde los 21 días, y tras el destete recibieron una dieta comercial de crecimiento (Cunimed-UPV). Ambas raciones incluyeron bacitracina de zinc (100 ppm) y robenidina (66 ppm). A los 17, 28 y 38 días del parto, se muestrearon cecotrofos de las madres y de dos de sus gazapos, empleando collares cervicales para evitar la cecotrofia.

La biodiversidad bacteriana se estimó mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), tal como describen Rodríguez-Romero et al. (2012). El ADN se extrajo con el kit QIAamp DNA (QIAGEN, West Sussex, UK) y se amplificó por PCR un fragmento del gen del ARNr 16S bacteriano con cebadores universales (Muyzer *et al.* 1993). Los geles se tiñeron con el kit DNA Silver Staining (Amersham Biosciences) y las imágenes se analizaron usando el programa Quantity One. Se construyeron dendrogramas utilizando el algoritmo UPGMA a partir del coeficiente Dice, y se determinó la riqueza y el índice de biodiversidad de Shannon en base a su presencia o ausencia. Los resultados se analizaron por ANOVA mediante el procedimiento GLM (SAS versión 8.2), según un diseño factorial 2 x 3, con el manejo del destete y la edad de los gazapos como factores, y considerando la camada dentro de manejo como error para contrastar el efecto del destete y el residual para contrastar el efecto edad y la interacción. Las medias de tratamientos se compararon por la mínima diferencia significativa ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La distribución de las comunidades microbianas de los conejos de cada sistema de manejo a los 17, 28 y 38 días postparto se muestra en las Figuras 1 a 3. A los 17 días (Figura 1), las comunidades bacterianas se agruparon en clados diferenciados en madres (M) y gazapos (G) lactantes, sin acceso a alimento sólido. Para facilitar la comparación entre gazapos según el manejo del destete, en las Figuras 2 y 3 se omiten los resultados de las madres. A los 28 días (Figura 2), los gazapos de los tratamientos D28 y D42 se agrupan en varios bloques, en los que el efecto de la camada es, en general, determinante en ambas edades,

y predomina sobre el efecto de la edad al destete ya que no se observa una diferenciación clara entre D28 y D42. A esta edad, todos los animales han recibido alimentación láctea con acceso al pienso de las madres, y por tanto las diferencias entre camadas deben responder al manejo de las conejas en lactaciones previas. A los 38 días (Figura 3), las poblaciones microbianas de los gazapos D42 se agrupan (índice de similitud de 0,52), excepto dos gazapos de una misma madre, con índice de similitud de 0,45 con los restantes D42, mientras que las poblaciones de los gazapos D28 muestran una mayor dispersión. Esto indica retrasar el destete a 42 días, manteniendo el acceso al pienso materno desde los 21 días, modifica de forma relevante el perfil de la población cecal de los gazapos. Como era de esperar, a los 17 o 28 días no hubo diferencias entre destetes en biodiversidad cecal, estimada en base al número de bandas o al índice de Shannon, (Tabla 1). Sin embargo, a los 38 días los conejos del manejo D42, todavía en lactación, mostraron mayor biodiversidad que los D28, destetados 10 días antes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, L., Fondevila, M., Balcells, J. & McEwan, N.R. 2007. *J. Appl. Microbiol.* 103:557-564
- Combes, S., Michelland, R.J., Monteils, V., Cauquil, L., Soulie, V., Tran, N.U., Gidenne, T. & Fortun-Lamothe, L. 2011. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77:680-689
 - de Blas, J.C., Chamorro, S., García-Alonso, J., García-Rebollar, P., García-Ruiz, A.I., Gómez-Conde, M.S., Menoyo, D., Nicodemus, N., Romero, C. & Carabaño, R. 2012. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173:102-110
 - Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 695-700
 - Rodríguez-Romero, N., Abecia, L. & Fondevila, M. 2012. *Anaerobe* 18: 602-607.

Tabla 1. Biodiversidad bacteriana (Riqueza e índice de Shannon,) en el ciego de gazapos destetados a 28 (D28) ó 48 (D48) días postparto, a los 17, 28 ó 38 días de edad.

	17 días		28 días		38 días		SEM	P
	D28	D42	D28	D42	D28	D42		
Riqueza	41,3a	43,9a	31,9b	30,9b	29,8b	39,4a	1,811	0,017
Ind. Shannon	3,71a	3,78a	3,44b	3,41b	3,36b	3,66a	0,061	0,033

Medias con letras distintas indican diferencias significativas (P<0,05)

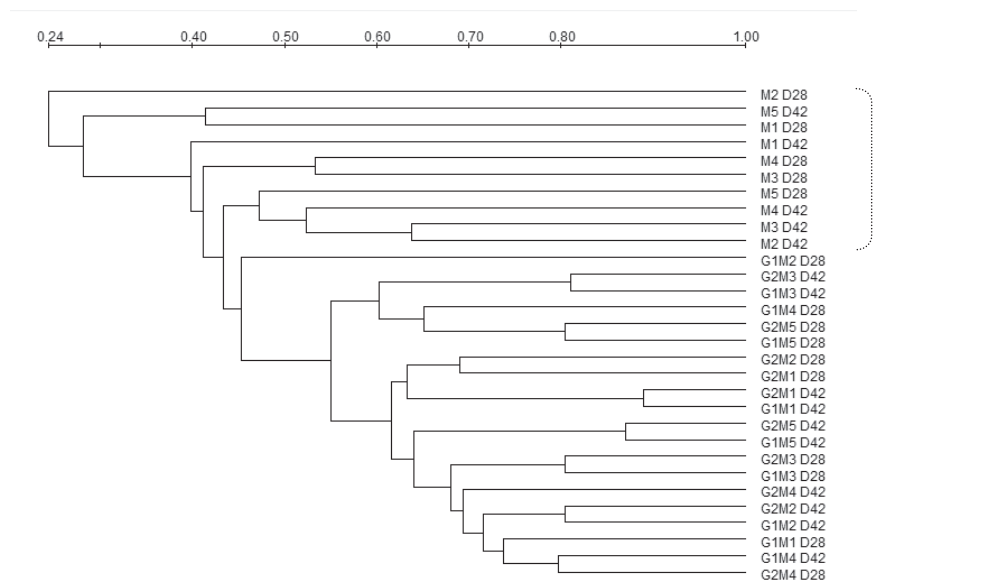


Figura 1. Dendrograma de similitud bacteriana en cecotrofos de hembras en lactación y de dos de sus gazapos a los 17 días de edad. M= madre; G=gazapos; D=edad al destete.

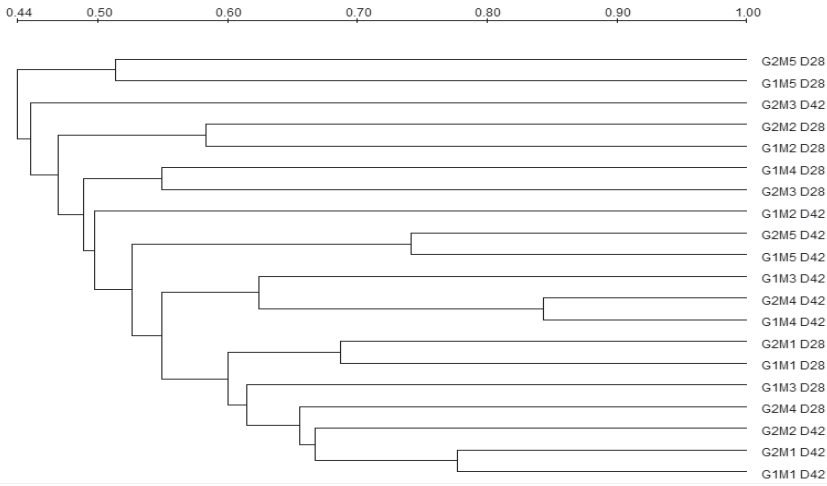


Figura 2. Dendrograma de similitud bacteriana en gazapos a los 28 días de edad.

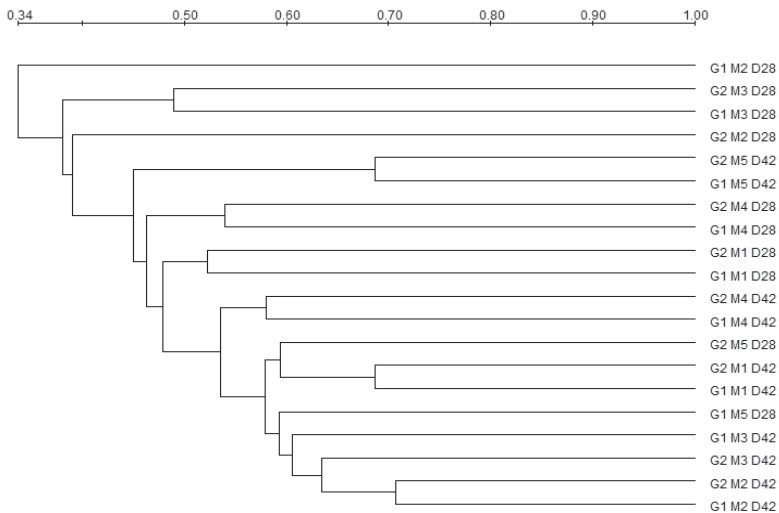


Figura 3. Dendrograma de similitud bacteriana en gazapos a los 38 días de edad.

EFFECT OF WEANING MANAGEMENT IN MULTIPAROUS DOES ON CAECAL MICROBIAL BIODIVERSITY OF THEIR PUPS

ABSTRACT: The biodiversity of microbial community in the caecum of multiparous does and their offspring weaned at 28 (D28) or 42 (D42) days was studied. Until weaning, pups had free access to the does' commercial diet and after that received a growth diet. Caecotrophes of does (n=5) and two pups of each litter were sampled at 17, 28 and 38 days after parturition. Microbial similarity was studied by DGGE, and biodiversity indexes were determined. Similarity of caecal microbiota in pups at 17 and 28 days was more affected by the does effect than by the age at weaning pups. At 38 days after parturition, a higher similarity and biodiversity in D42 ($P<0.05$) indicates higher microbial biodiversity when weaning is delayed.

Keywords: rabbits, microbial biodiversity, DGGE, caecotrophes

DETERMINACIÓN DE ARQUEAS Y BACTERIAS TOTALES CON MÉTODOS DE PCR DIRECTA PARA MONITORIZAR DIGESTORES ANAEROBIOS ALIMENTADOS CON PURINES DE CERDO

Moset^{1,3}, V., Bertolini², E., Cerisuelo¹, A., Olmos², A., Cambra², M., Cambra-López³, M.

¹Centro de Investigación de Tecnología Animal (CITA-IVIA). Pol. de la Esperanza, 100. 12400, Segorbe, Castellón. ²Centro de Protección Vegetal y Biotecnología (IVIA). Ctra. Moncada-Náquera km 4,5 Moncada, Valencia, España. ³Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia. .

E-mail: cerisuelo_alb@gva.es

INTRODUCCIÓN

El metano (CH₄) es un gas con efecto invernadero producido por la descomposición anaerobia de la materia orgánica. Tanto la emisión entérica de CH₄ como la producida por el almacenamiento de deyecciones ganaderas es un proceso indeseado por las implicaciones ambientales. Sin embargo, en condiciones controladas (digestores anaerobios), el CH₄ generado se utiliza como fuente de energía renovable. Por tanto, el control de la producción de CH₄ resulta indispensable para evitar emisiones indeseadas y promover fuentes de energía limpias. La producción de CH₄ depende del establecimiento de tres grupos de microorganismos (acidogénicos, acetogénico y metanogénicos). Por tanto el control de las poblaciones microbiológicas permitiría controlar la producción de CH₄. Sin embargo, no existen indicadores microbiológicos eficaces y aplicables en condiciones de campo. De hecho parámetros fisicoquímicos, como la evolución de los ácidos grasos volátiles (AGV) y la producción de CH₄, son utilizados actualmente para estimar la evolución de las poblaciones microbiológicas en purines y digestores anaerobios (Moset et al., 2012).

La PCR supone una alternativa rápida, específica y con alta sensibilidad. Sin embargo esta metodología presenta algunas limitaciones relacionadas con la extracción de ADN viable, la dificultad de aplicación en condiciones de campo y la imposibilidad de distinguir entre el ADN viable y el inviable de las muestras.

La PCR directa (dPCR) permite utilizar directamente la muestra al eliminarla recuperación de células y la extracción de ADN y por tanto resulta un proceso rápido, simple y rentable. La dPCR es actualmente utilizada con éxito con cultivos de células bacterianas, animales, sangre y muestras ambientales para detectar y cuantificar las bacterias (Benson et al., 2004). Sin embargo esta metodología no se ha aplicado a poblaciones de arqueas metanogénicas.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de dos métodos dPCR (dilución y spot) y compararlos con los kits comerciales para la extracción de ADN (Quiagen) en un análisis de PCR, así mismo se evaluó la relación entre estas metodologías con parámetros fisicoquímicos de los digestores anaerobios (emisión de CH₄ y concentración AGV). Estos resultados pueden confirmar el uso de técnicas moleculares como la dPCR en el control de la producción de CH₄.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron tres digestores anaerobios termofílicos de 5 L de capacidad alimentados con purines de cerdo (1 g sólidos volátiles (SV)/d durante un periodo experimental de 90 días. Semanalmente se determinaron: la producción de biogás de cada digestor, mediante medidores de flujo (RITTER®, Bochum, Alemania), la concentración de CH₄ del biogás, por cromatografía de gases (Focus Thermo, Milán, Italia) siguiendo la metodología descrita por Moset et al. (2012), y la concentración de ácidos grasos volátiles, por cromatografía de gases mediante detector de ionización de llama (HP 68050 serie Hewlett Packard) según la técnica propuesta por Jouany (1982) con la adición de un patrón interno (4-metil valérico).

Los días 0, 28, 47, 76 y 89 del periodo experimental se tomaron muestras (20 ml; tubos falcon) de cada digestor se ultracongelaron con nitrógeno líquido y almacenaron a -40 °C. Dos métodos de dPCR se utilizaron para este estudio: dilución (Dil) y spot (Spot). Inmediatamente después de la descongelación se tomaron dos alícuotas de cada tubo (250 µL en tubos eppendorfs) que se incubaron (100 °C; 10 min). El primero de ellos (Dil) se diluyó (1x10⁻³ con agua libre de nucleasa Compañía, Ambion, EE.UU.) utilizando dicha

dilución directamente en la PCR. El segundo (Spot) fue también diluido (1×10^{-2}) y 5 μ L de la dilución fueron puestos sobre un papel de filtro previamente autoclavado de 0,45 μ m (Whatman 3MM; Midwest Scientific, Valley Park, Missouri, EE.UU.). Después de 30 minutos a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar, se introdujeron 100 μ L de agua libre de nucleasa (Ambion, EE.UU.) en el eppendroff tras una agitación de 5 minutos el líquido resultante fue utilizado directamente en la reacción de la PCR.

Además de cada muestra descongelada, se extrajo el ADN (250 μ L/muestra) mediante QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania)(Extr).

El coctel utilizado para la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 12 μ L con 2 μ L de muestra, 6 μ L de solución de Master Mix (Applied Biosystems, España), 0,6 μ L de cada primer (concentración final 0,5 mM) y 0,18 μ L de la sonda TaqMan (concentración final 0,15 mM). Los primers y sondas utilizados fueron los descritos por Yu et al. (2005). Las condiciones de la PCR fueron modificadas a partir de las propuestas por Yu et al. (2005) de la siguiente manera:

- Arqueas totales: 95 °C durante 10 min seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s
- Bacterias totales: 95 °C durante 10 min seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s and 73 °C durante 30 s.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo por triplicado en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, España). Además se usaron reacciones de control sin ADN en todas las reacciones. La adquisición de datos y el análisis se realizaron utilizando StepOne Plus 2.0 (Applied Biosystems, España). Para determinar la correlación entre el ciclo umbral (Ct) de arqueas y bacterias totales determinado con cada uno de los métodos de PCR y de éstos con los parámetros del digestor (AGV y CH₄) se realizó un estudio exploratorio utilizando el procedimiento PROC CORR del paquete estadístico SAS®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra el promedio de los resultados de la PCR con cada uno de los métodos, la concentración de ácidos grasos volátiles y la producción de CH₄ a lo largo del periodo experimental. Se puede observar que la variabilidad en los Ct obtenidos con la Extrac en el tiempo es menor que con la dPC tanto en arqueas como en bacterias. En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, la cantidad de CH₄ producido se redujo considerablemente el día 28 del periodo experimental en todos los digestores aumentando posteriormente mientras que la concentración de ácidos grasos totales se mantuvo constante durante el periodo experimental, disminuyendo la concentración de acético y aumentando la de propionico con el tiempo.

TABLA 1: Promedio de los resultados de la PCR con cada uno de los métodos, la concentración de ácidos grasos volátiles y la producción de metano a lo largo del periodo experimental.

		Tiempo, días				
		0	28	47	76	89
Arqueas	Extracción, Ct	32,9±0,85	32,6±0,86	32,1±0,23	32,9±0,43	32,8±0,54
	Dilución, Ct	38,7±0,83	36,9±0,43	41,2±1,04	42,4±1,26	42,0±0,78
	Spot, Ct	39,4±0,66	37,1±0,41	40,7±0,52	39,9±0,25	40,4±0,62
Bacterias	Extracción, Ct	21,8±0,24	21,6±0,82	19,8±0,12	20,1±0,62	20,4±0,53
	Dilución, Ct	26,7±0,54	26,0±1,55	28,9±0,68	28,2±0,37	27,8±1,05
	Spot, Ct	29,4±0,71	28,0±0,94	30,0±0,52	29,2±0,69	29,6±0,76
Parámetro fisicoquímico	AGV, g L ⁻¹	1,5±0,43	1,7±0,90	1,9±0,54	2,1±0,61	1,5±0,42
	Acético, g L ⁻¹	1,2±0,39	1,2±0,64	1,0±0,24	0,6±0,2	0,4±0,2
	Propionico, g L ⁻¹	0,1±0,04	0,5±0,12	0,8±0,302	1,3±0,48	1,0±0,42
	Metano, L CH ₄ Kg SV ⁻¹	123,8±19,08	66,5±17,77	127,8±16,34	140,9±22,19	139,7±7,47

Por tanto, a lo largo del periodo experimental se produjeron cambios importantes tanto en la composición del digestato como en la producción de CH₄. Para evaluar si existió una relación entre concentración de AGV y la producción de CH₄ y las poblaciones de arqueas y bacterias totales con cada uno de los métodos se correlacionaron ambos grupos de parámetros. Según los resultados del análisis no existió una correlación entre el Ct obtenido en la determinación de arqueas totales mediante Extr con los dos otros métodos (Dil o Spot), tampoco se correlacionaron la concentración de AGV y la producción de CH₄. Sin embargo, se observó una alta correlación entre las dos metodologías de dPCR (Dil y Spot) para la determinación de arqueas totales (R= 0,95, P<0,001). Así mismo los Ct obtenidos con las dos metodologías de dPCR en arqueas totales resultaron positivamente correlacionadas con la producción de CH₄ (R=0.72, P<0.001 y R=0.68 P<0.01 respectivamente) y negativamente con la concentración de acético en el digestor (R=-0.46, P<0.05 y R=-0.49 P<0.05 respectivamente).

En cuanto a la determinación de bacterias totales, el Ct obtenido en la determinación de bacterias totales con Extr resultó negativamente correlacionado con la producción de CH₄ (R=-0.70, P<0.01). Los Ct obtenidos con Dil y Spot resultaron positivamente correlacionados entre sí (R=0.77, P<0.001). Así mismo el Ct obtenido en la determinación de bacterias totales mediante Dil resultó positivamente correlacionada con la producción de CH₄ de los digestores (R=0.46, P<0.05) y con la concentración de propiónico (R=0.77, P<0.001) en los mismos.

La baja correlación entre los parámetros fisicoquímicos determinados y las poblaciones de arqueas totales y bacterias totales determinadas con Extr puede deberse a la incapacidad de los kits de extracción para distinguir entre el ADN procedente de células vivas, no vivas, latentes o el ADN libre presente en las muestras (Solera et al., 2001), la mayor correlación entre Spot y Dil con éstos parámetros podría deberse a que la incubación previa podría haber degradado el ADN libre presente en las muestras.

REFERENCIAS

Benson, J.A., Fode-Vaughan, K.A., Collins, M.L.P. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 221-225 • Jouany J P (1982). Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sciences des aliments*. 2(2): 131-144 • Moset V, Cerisuelo A, Sutaryo S, Møller HB. 2012. Process performance of anaerobic co-digestion of raw and acidified pig slurry. *Water Research*, 46:5019-5027 • Solera R, Romero LI, Sales D. 2001. Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: Comparative analysis by different counting methods. *Anaerobe*, 7: 79-86 • Yu Y, Kim J, Hwang S. Use of real-time PCR for group-specific quantification of aceticlastic methanogens in anaerobic processes: Population dynamics and community structures. *Biotechnology and Bioengineering*, 93: 424-433.

TOTAL ARCHAEA AND BACTERIA DETERMINATION USING DIRECT PCR METHODS TO MONITOR ANAEROBIC DIGESTERS FED WITH PIG SLURRY

ABSTRACT:

The objective of this study was to evaluate two direct PCR methods (dilution and spot) to determine total bacteria and total archaea populations and to compare these results with those obtained using a commercial kit for DNA extraction (Qiagen). Additionally these PCR methodologies were compared with physicochemical parameters, volatile fatty acids (VFA) and methane production (CH₄), in three anaerobic digesters fed with pig slurry during 90 days. The PCR carried with samples from DNA extracted with Qiagen showed a low correlation with direct PCR in total archaea and bacteria determination. In total bacteria determination samples from DNA extraction with Qiagen were correlated with CH₄. Direct PCR methodologies were correlated between them and with CH₄ and individual VFA (propionic and acetic) in total bacteria and total archaea determination.

Keywords: direct PCR, total archaea, total bacteria, methane, pig slurry



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

CIHEAM/IAMZ - Cursos 2012-13-14

CIHEAM

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
PRODUCCIÓN VEGETAL	* MEJORA GENÉTICA VEGETAL	1 Oct. 12/7 Jun. 13	Zaragoza	IAMZ/UdL
	* OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA	23 Sep. 13/30 Mayo 14	Córdoba	UCO/JA/CSIC/COI/INIA/IAMZ
	APLICACIONES DE LA BIOINFORMÁTICA EN MEJORA VEGETAL	20-24 Ene. 14	Zaragoza	IAMZ
	ENFERMEDADES EMERGENTES Y DE CUARENTENA EN CULTIVOS HORTOFRUTÍCOLAS MEDITERRÁNEOS	31 Mar./4 Abr. 14	Zaragoza	IAMZ
PRODUCCIÓN ANIMAL	CALIDAD DE LA CARNE Y DE PRODUCTOS CÁRNICOS EN RUMIANTES	17-21 Sep. 12	Zaragoza	IAMZ
	METODOLOGÍAS DE DIAGNÓSTICO ACTUALES Y FUTURAS EN SANIDAD ANIMAL	14-18 Ene. 13	Zaragoza	IAMZ/OIE/FAO
	EVALUACIÓN MEDIOAMBIENTAL DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN GANADERA	15-20 Abr. 13	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto RedNEX/EAAP
	SEGURIDAD DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL: CARNE, AVES Y HUEVOS	6-10 Mayo 13	Zaragoza	IAMZ
	* NUTRICIÓN ANIMAL	30 Sep. 13/6 Jun. 14	Zaragoza	IAMZ/UZ/FEDNA/UPM

(* **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: 12-13; 14-15; 16-17
- OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA: 13-14; 15-16; 17-18
- NUTRICIÓN ANIMAL: 13-14; 15-16; 17-18
- MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN: 14-15; 16-17
- PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE: 12-13; 14-15; 16-17
- MARKETING AGROALIMENTARIO: 13-14; 15-16; 17-18
- ACUICULTURA: 12-13; 14-15; 16-17
- GESTIÓN PESQUERA SOSTENIBLE: 13-14; 15-16; 17-18

Se destinan primordialmente a titulados universitarios 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 de 2013. El plazo de inscripción para los cursos de Nutrición animal, Marketing agroalimentario y Gestión pesquera sostenible finaliza el 3 de mayo de 2013. El plazo de inscripción para los cursos de Mejora genética vegetal, Planificación integrada para el desarrollo rural y la gestión del medio ambiente, Mejora genética animal y biotecnología de la reproducción y Acuicultura finaliza el 2 de mayo de 2014.

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.

Erasmus Mundus Master (** marcado con dos asteriscos en el listado). Se celebra todos los años. Para obtener mayor información y realizar la solicitud consulte la página web <http://www.master-edamus.eu/>

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, Libano, 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	1 Oct. 12/7 Jun. 13	Zaragoza	IAMZ/UdL
	GESTIÓN DE LOS INCENDIOS FORESTALES PARA AFRONTAR CAMBIO CLIMÁTICO Y SOCIOECONÓMICO	20-25 Mayo 13	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto EL FUME
	PREDICCIÓN DE LA SEQUÍA Y SU UTILIZACIÓN PARA LA TOMA DE DECISIONES	23-27 Sep. 13	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto DEWFORA
	INSTRUMENTOS DE MERCADO Y PAGO POR SERVICIOS AMBIENTALES EN ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS	17-21 Feb. 14	Zaragoza	IAMZ/EFIMED/ IUCN
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS GEOESPACIALES EN ESTUDIOS AMBIENTALES	9-20 Jun. 14	Zaragoza	IAMZ
TECNOLOGÍA Y MARKETING DE ALIMENTOS	NUEVAS OPORTUNIDADES PARA LA EXPORTACIÓN Y PROMOCIÓN DE LOS PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS	12-16 Nov. 12	Zaragoza	IAMZ
	** MÁSTER ERASMUS MUNDUS EN GESTIÓN SOSTENIBLE DE LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS (EDAMUS)	Sept. 13-Jun. 15 / Sept. 14-Jun. 16	Montpellier y otros países del Consorcio	UM1/IAMM/ IAMZ/ UNIBAS/ IAMCh/ UC1
	* MARKETING AGROALIMENTARIO	30 Sep. 13/6 Jun. 14	Zaragoza	IAMZ
	INNOVACIÓN EN ENVASES DE FRUTAS Y VERDURAS FRESCAS Y MÍNIMAMENTE PROCESADAS	21-25 Oct. 13	Zaragoza	IAMZ
	ESTRATEGIAS DE MARKETING DE ACEITE DE OLIVA	4-9 Nov. 13	Zaragoza	IAMZ/COI
	MICOTOXINAS EN CEREALES Y PRODUCTOS DERIVADOS: ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL PARA MINIMIZAR LA CONTAMINACIÓN	12-16 Mayo 14	Zaragoza	IAMZ/Agrotecnio
PESCA Y ACUICULTURA	* ACUICULTURA	15 Oct. 12/28 Jun. 13	Las Palmas de Gran Canaria	ULPGC/ICCM/IAMZ
	NUTRICIÓN DE PECES: SOSTENIBILIDAD Y CALIDAD DE LOS PRODUCTOS	26-30 Nov. 12	Zaragoza	IAMZ
	ESTUDIOS DE MARKETING DE PRODUCTOS DEL MAR	10-14 Dic. 12	Zaragoza	IAMZ/FAO
	PROCESADO DE PRODUCTOS DEL MAR: TECNOLOGÍAS MODERNAS Y DESARROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS	4-8 Feb. 13	Vigo	IAMZ/FAO/ANFACO- CECOPESCA
	* GESTIÓN PESQUERA SOSTENIBLE	14 Oct. 13/ 13 Jun. 14	Alicante	UA/MAGRAMA/ IAMZ
	USO DE LOS SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA EN PESCA Y ACUICULTURA	18-29 Nov. 13	Zaragoza	IAMZ
	AVANCES TÉCNICOS EN FASE INICIAL DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES MARINAS DE INTERÉS ECONÓMICO	13-17 Ene. 14	Las Palmas de Gran Canaria	IAMZ/ULPGC/UE-Proyecto AQUATRANS
	EL ENFOQUE ECOSISTÉMICO DE LA PESCA EN EL MEDITERRÁNEO Y EL MAR NEGRO. BASES CIENTÍFICAS	3-7 Feb. 14	Varna (Bulgaria)	IAMZ/UE-Proyecto CREAM
EL ENFOQUE ECOSISTÉMICO DE LA PESCA EN EL MEDITERRÁNEO Y EL MAR NEGRO. GESTIÓN Y TOMA DE DECISIONES	10-14 Mar. 14	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto CREAM	

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

