

ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO (AIDA)

XVI JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL

19 y 20 de mayo de 2015

Zaragoza

TOMO II

COLABORAN:

Gobierno de Aragón

Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Regional

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón

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: XVI Jornadas sobre Producción Animal

Edita: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Textos: Autores

Colección: Congresos y Jornadas

Serie: Producción Animal

Editores:

Javier Álvarez Rodríguez
Begoña Panea Doblado
Jorge Hugo Calvo Lacosta
Mireia Blanco Alibés
Alfonso Abecia Martínez
Daniel Villalba Mata
M^a Ángeles Latorre Górriz

Secretario administrativo: Joaquín Moreno Miguel

Foto portada: Margalida Joy Torrens

XVI Jornadas sobre Producción Animal Tomo II	DIRECCIÓN Y REDACCIÓN Montañana, 930 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA (ESPAÑA)	ISBN Tomo II: 978-84-606-7971-4 Depósito legal: Z-673-2015 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:



ÍNDICE

TOMO II

REPRODUCCIÓN

Reproducción: Sistemas reproductivos-Bovino

- ENTRADA EN PUBERTAD Y FERTILIDAD DE NOVILLAS PARDA DE MONTAÑA Y PIRENAICA SOMETIDAS A DISTINTOS RITMOS DE CRECIMIENTO DURANTE LA RECRÍA. Rodríguez-Sánchez, J.A., Sanz, A. y Casasús, I. 331
- INTERVALO ENTRE PARTOS, CONDICIÓN CORPORAL AL PARTO Y DURACIÓN DE LA LACTACIÓN DE VACAS EXPLOTADAS BAJO PARIDERA CONTINUA EN EL ECOSISTEMA DE LA DEHESA: FACTORES DE VARIACIÓN. Daza, A. 334
- EFECTO DE DIVERSOS FACTORES DE EXPLOTACIÓN SOBRE EL INTERVALO ENTRE PARTOS DE VACAS DE RAZA BERRENDA EN NEGRO. Álvarez, S., Palacios, C. y Sánchez-Ocaña, A. 337
- ESTADO REPRODUCTIVO ACTUAL DEL SECTOR BOVINO LECHERO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS. Jiménez-Calderón, J.D., Martínez-Fernández, A. y Vicente, F. 340
- EFECTO DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) EN LA TASA DE FERTILIDAD EN VACAS DE LECHE CRUZADAS BAJO CONDICIONES DE ALTITUD EN ECUADOR. Garnica, F.P., Sagbay, C., Brito, M.C., Masache, J.L., Webster, P.G. y Minguez, C. 343
- ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON PROGESTERONA A DIA 16-19 POST-INSEMINACION SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ESTIMULADOS POR INTERFERÓN TAU (IFN- τ) EN VACAS LECHERAS. López-Helguera, I., Tuono, T., Mur, R., López-Gatius, F. y Serrano-Pérez, B. 346

Reproducción: Calidad del semen

- CALIDAD SEMINAL DE EYACULADOS FRESCOS DE LA RAZA CABRA BLANCA DE RASQUERA. Orus, A., Ventós, A., Tabarez, A., García, W., Osuagwuh, U. y Palomo M.J. 349
- DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS SEMINALES DEL CONEJO IBICENCO. Sánchez-Rodríguez A., Masdeu M., García-García R.M., Arias-Álvarez M., Lorenzo P.L., Rebolgar P.G. 352
- UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN MORUECOS DE ALTA Y BAJA FERTILIDAD EN CAMPO. Yániz, J.L., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Sánchez-Nadal, J.A., Santolaria, P. 355
- EFECTO DEL FLUIDO UTERINO Y DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE PORCINA. Abril-Sánchez, S., Soriano-Úbeda, C., Matás, C., García-Vázquez, F.A. 358
- VARIACIÓN ESTACIONAL EN EL PERFIL PROTEICO DEL PLASMA SEMINAL DE DOS LÍNEAS DE CONEJOS. Casares-Crespo, L., Talaván, A.M. y Viudes-de-Castro, M.P. 361
- BAJO CONDICIONES *IN VITRO*, LA ADHESIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A LAS CÉLULAS DEL OVIDUCTO SE VE FACILITADA SI NO TIENEN EXTERIORIZADA LA FOSFATIDILSERINA. López-Úbeda R., Diego R. y Matás C. 364

- EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE LA CALIDAD IN VITRO Y LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN FRESCO Y CRIOCONSERVADO DE GALLOS DE RAZA GALLINA VALENCIANA DE CHULILLA. Fajardo, A., Tomás, C., Blanch, E., Gómez, E.A., Casares-Crespo, L., Sansano, S., Giménez, I., y Mocé, E. 367

Reproducción: Valoración del semen (I)

- EVALUACIÓN DEL COLOIDE *ANDROCOLL™* PARA SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS DE CIERVO. Crespo-Félez, I., Pardal, S., Mata-Campuzano, M., Castañeda, A., Morrell, J. y Martínez-Pastor, F. 370
- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN CONEJO. Casares-Crespo, L., Talaván, A.M. y Viudes-de-Castro, M.P. 373
- LA COMPOSICIÓN DEL DILUYENTE INFLUYE EN LA DINÁMICA DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN EL MORUECO. Yániz, J.L., J. Gosálvez, J., López-Fernández, C., Santolaria, P. 376
- IMPORTANCIA DE LA VALORACIÓN DE PARÁMETROS APOPTÓTICOS EN MUESTRAS SEMINALES PARA LA SELECCIÓN DE SEMENTALES. Casao, A., Macías A., Laviña, A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. y Pérez-Pé, R. 378

Reproducción: Valoración del semen (II)

- ESTUDIO DE LOS NIVELES DE PROTAMINA1 Y FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN ESPERMA DE MORUECO EXTRAIDO EN PRIMAVERA Y VERANO. Sánchez-Espada, A.I., Serrano, M., Gosálvez, J., y Roy R. 381
- ANÁLISIS DE LA CROMATINA EN ESPERMATOZOIDES DE *BUFO CALAMITA*. Pardal, S., Crespo-Félez, I., Mata-Campuzano, M., Martínez-Pastor, F. y Arregui, L. 384
- EVALUACIÓN DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA EN MUESTRAS SEMINALES PORCINAS. Mondéjar, I., Coy, P. y Gadea, J. 387

Reproducción: Actividad Sexual

- EFECTO DE LA ESTACIÓN DE CUBRICIÓN SOBRE LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS DE CERDAS EN ARAGÓN. Galé, I., Izaquirre, M., Grandía, J., y Daza A. 390
- LA PRESENCIA DE LOS MACHOS CABRÍOS SEXUALMENTE ACTIVOS EVITA EL ANESTRO ESTACIONAL EN LAS HEMBRAS. Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Hernández, H., Keller, M., Poindron, P., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Vielma, J., Fernández, I.G. y Chemineau, P. 393
- EL CONTACTO PERMANENTE CON MACHOS ESTIMULADOS CON FOTOPERIODO ARTIFICIAL Y MELATONINA MODIFICA LA ACTIVIDAD OVARICA DE OVEJAS RASA ARAGONESA EN PRIMAVERA. Abecia, J.A., Flores, J.A., Keller, M., Forcada, F., Duarte, G., Chemineau, P. y Delgadillo, J.A. 396
- EFECTO DE LA METEOROLOGÍA SOBRE LA FERTILIDAD TRAS INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE CABRAS DE RAZA PAYOYA EN PRIMAVERA. Arrébola, F., González-Casquet, O., Benítez, F., Palacios, C., Abecia, J.A. 399
- DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO INTRAVAGINAL PARA LA RECOGIDA DE SEMEN EN GANADO OVINO. Mozo, R., Alabart, J.L., Rivas, E., Echegoyen, E., Navarro, M.A. y Folch, J. 402

Reproducción: Patología-Genética de la Reproducción

- RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA Y CALIDAD SEMINAL CON EL GRADO DE PARASITACIÓN POR PIOJOS (*MENACANTHUS STRAMINEUS*) EN RAZAS AUTÓCTONAS DE GALLINAS ESPAÑOLAS. Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M.A., López-Sebastián, A., Campo, J.L. y Santiago-Moreno, J. 405
- DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS ENTRE LA PERDIZ ROJA PURA (*ALECTORIS RUFA*) Y CON INTROGRESIÓN GENÉTICA (*ALECTORIS RUFA* X *ALECTORIS CHUKAR*) DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA. Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Torres, O., Gil M.C., Dávila, S.G., Velázquez, R., Campos, J.L., Esteso, M.C., López-Sebastián, A. y Santiago-Moreno, J. 408
- EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE LA TRICOMONOSIS BOVINA EN ESPAÑA Y NUEVAS ALTERNATIVAS PARA SU CONTROL. Collantes-Fernández, E., Rojo-Montejo, S., Sánchez-Sánchez, R., Navarro-Lozano, V., Moreno-Gonzalo, J., Román-Trufero, A., Osoro, K. y Ortega-Mora, L.M. 411
- CINÉTICA DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN VACAS LECHERAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *NEOSPORA CANINUM*. Serrano-Pérez, B., Mur-Novales, R., López-Helguera, I., Darwich, L., Cabezón, O., García-Ispuerto, I., López-Gatius, F. y Almería, S. 414
- LESIONES DE LA CERDA EN EXPLOTACIÓN INTENSIVA Y SU RELACIÓN CON LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS. Galé, I., Izaquirre, M., Grandía, J. y Daza, A. 417

Reproducción: Alimentación-Melatonina

- IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE MELATONIA MT₁ Y MT₂ EN EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MOURUECO. González-Arto, M., Aguilar, D., Gaspar, E., Hamilton, RST., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A y Casao, A. 420
- EFECTO DE LA EDAD DEL DONANTE Y DE LA APLICACIÓN DE IMPLANTES DE MELATONINA EN LA CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA OVINA. García, W., Tabarez, A., Marin, S., Osuagwuh, U. y Palomo M.J. 423
- EFECTO DE DISTINTAS ESTRATEGIAS ALIMENTARIAS Y DE SINCRONIZACIÓN DE CELO SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN CONEJAS REPRODUCTORAS. Rodríguez, M., Velasco, B., López-Tello J.2 García-García R.M., Arias-Álvarez M., Lorenzo P.L. y Rebollar, P.G. 426
- ESTUDIO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESTRICCIÓN ALIMENTARIA SOBRE EL DESARROLLO FETOPLACENTARIO EN LA CONEJA. López-Tello, J., Arias-Álvarez, M., García-García, R.M., Rodríguez, M., Formoso-Rafferty, N., Bermejo-Poza, R., Lorenzo, P.L. y Rebollar, P.G. 429
- PIENSOS RICOS EN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS n-3 AUMENTAN LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN GESTACIÓN, MEJORAN LA FERTILIDAD Y EL TAMAÑO DE LOS NACIDOS VIVOS DE LAS CONEJAS. Febrel, N., Rodríguez, M., López-Tello, J., Velasco, B., Millán, P., García-García, R.M., Arias-Álvarez, M., Lorenzo, P.L., Rebollar, P.G. 432

Reproducción: Embriones

- EFECTO DEL BICARBONATO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEIN KINASA A (PKA) Y LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA ESPECIE PORCINA. Soriano-Úbeda, C., Matás, C., García-Vázquez, F.A. 435

- REGIONES DEL GENOMA ASOCIADAS CON TAMAÑO DE CAMADA EN CERDAS IBÉRICAS TORBISCAL. Rodríguez, MC., Barragán C., Nuñez, Y., García, F. y Silió L. 477
- DETECCIÓN DE *eQTLs* ASOCIADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL MÚSCULO PORCINO. Puig-Oliveras, A., Revilla, M., Martínez, A.M., Folch, J.M. y Ballester, M. 480

Genética: Estudios de asociación gen candidato

- EFECTOS ADITIVOS, DOMINANTES Y EPISTÁTICOS DE LOS GENES *SCD* Y *LEPR* SOBRE EL CONTENIDO Y LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA EN CERDO. Gol, S., Ros-Freixedes, R., Tor, M., Pena, R. N., Rothschild, M. F., y Estany, J. 483
- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES *PPAR α* , *PPAR δ* Y *PPAR γ* EN CERDOS IBÉRICOS. Benítez R., Muñoz G., Fernández A., Barragán C., Núñez Y., Rodríguez M.C., Silió L. y Óvilo C. 486
- ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR 1 DE MELANOCITOS (*MC1R*) Y EL LOCUS *E* PARA EL COLOR DEL PLUMAJE EN GALLINAS. Dávila, S. G., Gil, M.G., Resino-Talaván, P., y Campo, J.L. 489
- IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE CNVs EN PORCINO. Revilla, M., Puig-Oliveras, A., Crespo-Piazuelo, D., Fernández, A.I., Ballester, M. y Folch, J.M. 492

Genética: Parámetros genéticos

- ESTIMACIÓN DE VARIANZA EPIGENETICA TRANSGENERACIONAL. Varona, L., Munilla, S., Mouresan, E. F., González-Rodríguez, A., Moreno, C. y Altarriba, J. 495
- EFECTO DEL GEN *BMP15* SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DEL TIPO DE PARTO EN OVEJAS RASA ARAGONESA. Bodin, L., Alabart, J.L., Fathallah, S, Jiménez-Hernando, M.A, Lahoz, B., David, I., Fantova, E. y Jurado, J.J. 498
- PARÁMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERES DE MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA EN MACHOS DE RAZA OVINA MANCHEGA. Jiménez-Rabadán, P., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R. y Ramón, M. 501
- PARÁMETROS GENÉTICOS Y EFECTOS DE CRUZAMIENTO EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CERDO IBÉRICO. Ibáñez-Escriche, N. y Noguera, J.L. 504
- COMPONENTES DE LA EFICIENCIA ALIMENTARIA EN CERDOS DUROC Y SU RELACIÓN GENÉTICA CON LA CALIDAD DE LA CARNE. Sánchez, J.P., Reixach, J., Quintanilla, R., Estany, J., Ibáñez-Escriche, N., Rothschild, M. y Piles, M. 507
- PARÁMETROS GENÉTICOS DE LAS ENFERMEDADES MÁS COMUNES EN EL ENGORDE DE GAZAPOS BAJO DOS REGÍMENES ALIMENTARIOS. Ragab, M., Sánchez, J. P., Ramon, J., Rafel, O. y Piles, M. 510
- COMPARACIÓN DE LA DURACION DE LA INMOVILIDAD MUSCULAR, EL COEFICIENTE ENTRE HETEROFILOS Y LINFOCITOS Y LA ASIMETRÍA FLUCTUANTE DE POLLITOS CRIADOS CON O SIN GALLINA CLUECA. Gil, M.G., Dávila, S.G. y Campo, J.L. 513
- MODELIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD MUTACIONAL SEGÚN LA EDAD DE LOS PROGENITORES EN RATONES C57BL/6J. Castillo, M., Medrano, J. F. y Casellas, J. 516

Genética: Selección rumiantes

- VARIANTES RARAS: ERRORES DE SECUENCIACIÓN Y HEREDABILIDAD FALTANTE. González-Recio, O., Daetwyler, H.D., MacLeod, I.M., Pryce, J.E., Bowman, P.J., Hayes, B.J. y Goddard, M.E. 519
- REGIONES CON ALTA PERMANENCIA DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMENTO ENTRE LAS POBLACIONES DE VACUNO DE CARNE ESPAÑOLAS. Mouresan, E. F., González-Rodríguez, A., Cañas-Álvarez, J. J., Munilla, S., Moreno, C., Altarriba, J., Baro, J. A., Díaz, C., Molina, A., Piedrafita, J. y Varona, L. 522
- EVOLUCIÓN DE LA IMPORTANCIA ECONÓMICA DE CARACTERES CONSIDERADOS EN EL OBJETIVO DE SELECCIÓN DE LA RAZA FRISONA ESPAÑOLA. Pérez-Cabal, M.A. y Charfeddine, N. 525
- ESTUDIO DE LA PRECISIÓN REALIZADA OBTENIDA EN LOS DOS AÑOS DE EVALUACIONES GENÓMICAS EN EL VACUNO LECHERO ESPAÑOL. Jiménez-Montero, J.A., Charfedinne, N. y González-Recio, O. 528
- IMPACTO ECONÓMICO DE LA MEJORA DE LA PRODUCTIVIDAD EN LA RENTABILIDAD DEL SECTOR VACUNO DE CARNE EN ESPAÑA. López-Paredes, J. y Alenda, R. 531
- CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR CALOR EN RUMIANTES DE APTITUD LECHERA. CORRELACIÓN ENTRE TOLERANCIA Y NIVEL PRODUCTIVO. Ramón, M., Serradilla, JM., Díaz, C., Molina, A., Pérez-Guzmán, MD., Serrano, M., Sánchez-Rodríguez, M. y Carabaño, MJ. 534

Genética: Selección monogástricos

- OPTIMIZACIÓN DE LA CREACIÓN DE POBLACIONES BASE EN PROGRAMAS DE MEJORA EN ACUICULTURA. Fernández, J., Toro, M. A., Sonesson, A. K. y Villanueva, B. 537
- EVALUACIÓN DEL USO DE MARCADORES GENÉTICOS EN LA PREDICCIÓN DEL VALOR GENÉTICO DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDO. Ros-Freixedes, R., Tor, M., Pena, R.N., y Estany, J. 540
- EFECTO DE LA SELECCIÓN POR VARIANZA RESIDUAL DEL TAMAÑO DE CAMADA SOBRE LA CONDICIÓN CORPORAL DE LA CONEJA. Calle, E. W., García, M.L., Blasco, A. y Argente, M.J. 543
- COMPARACION DE GRADOS DE MADUREZ EN LINEAS COMERCIALES SELECCIONADAS POR DIFERENTES CARACTERES EN CONEJOS. Calle, E.W., Blasco, A. y Pascual, M. 546
- SELECCIÓN POR TASA DE OVULACIÓN Y TAMAÑO DE CAMADA EN CONEJO. RESPUESTA CORRELACIONADA EN SUPERVIVENCIA PRENATAL. Badawy A.Y., Peiró R., Blasco, A. y Santacreu, M.A. 549
- RESPUESTA A LA SELECCIÓN POR GRASA INTRAMUSCULAR DEL LOMO EN CONEJO Y RESPUESTAS CORRELACIONADAS EN OTROS MÚSCULOS. Martínez-Álvoro, M. Juste, V., Blasco, A y Hernández, P. 552
- EFECTO DE LA SELECCIÓN DIVERGENTE POR GRASA INTRAMUSCULAR EN CARACTERES DE METABOLISMO LIPÍDICO EN CONEJO. Martínez-Álvoro, M., Agha, S., Juste, V., Blasco, A. y Hernández, P. 555
- SIETE GENERACIONES DE SELECCIÓN DIVERGENTE PARA LA VARIABILIDAD DEL PESO AL NACIMIENTO EN RATONES. Formoso-Rafferty, N., Ibáñez-Escriche, N. , Gutiérrez, J.P. y Cervantes, I. 558

Genética: Huellas de selección y diversidad genética

- ANÁLISIS BAYESIANO PARA LA DETECCIÓN DE HUELLAS DE SELECCIÓN EN POBLACIONES DE VACUNO DE CARNE ESPAÑOL. González-Rodríguez A., Munilla S., Mouresan E.F., Cañas-Álvarez, J. J., Baro, J. A., Molina, A., Díaz, C., Piedrafita, J., Altarriba J. y Varona L. 561
- DETECCIÓN DE HUELLAS DE SELECCIÓN UTILIZANDO EL RADIO ESPECTRAL DE LA MATRIZ DE COANCESTRÍA MOLECULAR. Munilla, S., González-Rodríguez, A., Mouresan, E. F., Moreno, C., Altarriba, J. y Varona, L. 564
- PATRONES INTRACROMOSÓMICOS DE CONSANGUINIDAD Y PARENTESCO EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE VACUNO LECHERO. Kleinman-Ruiz, D., Villanueva, B., Fernández, J., Toro, M. A., García-Cortés, L. A. y Rodríguez-Ramilo, S. T. 567
- NORMALIZACIÓN DE COEFICIENTES DE CONSANGUINIDAD BASADOS EN REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD. Gomez-Raya, L., Rodríguez, C., Barragán, C. y Silió, L. 570

Genética: Huellas de selección y diversidad genética

- HUELLA DE MÚLTIPLES INTROGRESIONES EN EL GENOMA MITOCONDRIAL DE LOS CERDOS DE ÁFRICA ORIENTAL. Noce, A., Amills, M., Manunza, A., Sánchez, A., Egbalsaied, S., Mercadé, A. y Masembe, C. 573
- EVALUACIÓN DE UN PANEL DE SNP PARA EL CONTROL DE FILIACIÓN EN LA RAZA OVINA RIPOLLESA. Casellas, J. 576
- BÚSQUEDA DE ALELOS ALTERNATIVOS ENTRE CERDOS IBÉRICOS Y DUROC. Barragán, C., Benítez, R., Fernández, A. I., Fernández, A., García, F., Núñez, Y., Ovilo, C., Rodríguez, C. y Silió, L. 579

CALIDAD DE LOS PRODUCTOS

Calidad de los productos: Manejo

- INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN, TAMAÑO DE EXPLOTACIÓN Y ASOCIACIONISMO EN EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS EN LECHE DE TANQUE DE OVEJA. Jiménez, L., Oliete, B., M.D. Pérez-Guzmán y Arias, R. 585
- EFECTO DE LOS GRADOS DÍA DE AYUNO Y DEL HACINAMIENTO PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE EL CONTENIDO ESTOMACAL Y RESPUESTA DE ESTRÉS EN TRUCHA ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*). Bermejo-Poza, R., De la Fuente, J., Pérez, C., Lauzurica, S., González de Chavarri, E., Díaz, M.T., Torrent, F. y Villarroel, M. 588
- FACTORES DE RIESGO QUE INFLUYEN EN LA INCIDENCIA DE HEMATOMAS Y ALTO pH MUSCULAR EN CANALES VACUNAS DURANTE EL TRANSPORTE Y LAS OPERACIONES PRE-SACRIFICIO EN COLOMBIA. Romero, M.P. y Miranda-de la Lama, G.C. 591
- EFECTO DE LA CASTRACIÓN SOBRE LOS RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS, LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL Y LA CALIDAD DE LA CARNE DE AÑOJOS DE RAZA TUDANCA. Serrano, E., Humada, M.J., Castrillo, B., Cimadevilla, C. y Chomón, N. 594
- EFECTO DE LA TEMPORALIDAD EN EL APROVECHAMIENTO DE LA MONTAÑERA SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y CALIDAD DE CANAL DE CERDO

IBÉRICO. García-Torres, S., Pérez, M., Martín-Tornero, E., Cabeza de Vaca, M., López-Gajardo, A., Prior, E., Contador, R., Osorio, C., Cava, R., Cantero, V., Ladero, L. y Tejerina, D.	597
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Calidad de los productos: Metodología

– RELACIÓN ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS DEL PLASMA SANGUÍNEO Y LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDOS DUROC. Tor, M., Tamayo, K., Tamayo, S., Vilaró, F., Ros-Freixedes, R., Gol, S., Henríquez, E., Álvarez-Rodríguez, J., Pena, R.N. y Estany, J.	600
– SENSORES NIRS PORTÁTILES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INDIVIDUALIZADO DE JAMONES DE CERDO IBÉRICO ANTES Y DESPUÉS DE LA SALAZÓN. Fernández-Navales, J., De Pedro Sanz, E., Guerrero, J. E., Garrido Varo, A. y Pérez-Marín, D.	603
– META-ANÁLISIS DEL EFECTO DEL PASTOREO VERSUS LA CRIANZA INTENSIVA EN LOS ÁCIDOS GRASOS SATURADOS EN LA CARNE DE CORDERO. Popova, T., Gonzales-Barron, U. y Cadavez, V.	606
– ESTUDIO DE META-ANÁLISIS DEL EFECTO DE ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EN LA FUERZA DE CORTE DE LA CARNE DE VACUNO. Xavier, C., Gonzales-Barron, U., Muller, A. y Cadavez, V.A.P.	609
– UTILIDAD DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES MEDIDOS A LOS TRES DÍAS <i>POST MORTEM</i> PARA PREDECIR LA CALIDAD SENSORIAL DE LA CARNE DE LA INDICACIÓN GEOGRÁFICA PROTEGIDA “CARNE DE LA SIERRA DEL GUADARRAMA” AL SEXTO DÍA DE MADURACIÓN. Miguel, E., Onega, E. y Ruiz de Huidobro, F.	612
– UTILIDAD DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES MEDIDOS A LAS 24 HORAS <i>POST MORTEM</i> PARA PREDECIR LA CALIDAD SENSORIAL DE LA CARNE DE LA INDICACIÓN GEOGRÁFICA PROTEGIDA “CARNE DE LA SIERRA DEL GUADARRAMA” AL SEXTO DÍA DE MADURACIÓN. Miguel, E., Onega, E. y Ruiz de Huidobro, F.	615
– INFLUENCIA DEL MÚSCULO Y LAS TEMPERATURAS DE COCINADO Y ENFRIADO EN LA DUREZA INSTRUMENTAL DE LA CARNE. Ripoll, G., Panea, B. y Albertí, P.	618
– ESTIMACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL COLOR DE LA CARNE DE POTRO A PARTIR DE MEDIDAS INSTRUMENTALES. Ruiz, M., Insausti, K., Gómez, I., Beriain, M.J. y Sarriés, M.V.	621

Calidad de los productos: Raza

– EFECTO DE LA RAZA Y EL SISTEMA DE LACTANCIA SOBRE EL COLOR DE LA CARNE DE CABRITOS DE 5 RAZAS ESPAÑOLAS. Panea, B., Ripoll, G., Albertí, P., Álvarez, R., Córdoba, M.G., Argüello, A. y Alcalde, M.J.	624
– EFECTO DE LA RAZA Y EL SISTEMA DE LACTANCIA SOBRE LA CALIDAD DE LA CANAL DE CABRITOS DE 5 RAZAS ESPAÑOLAS. Panea, B., Ripoll, G., Albertí, P., Córdoba, M.G., Argüello, A. y Alcalde, M.J.	627
– INFLUENCIA DEL CRUCE SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE DE CERDO CELTA SACRIFICADO A 12 MESES. Lorenzo, J.M., Fernández, M., Iglesias, A., Carril, J. A., Domínguez, R. y Franco, D.	630

- EFECTO DEL GENOTIPO EN LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LA CARNE DE TERNEROS PRODUCIDOS EN EL VALLE DEL NANSA (CANTABRIA). Aldai, N., Lavín, P., Jaroso, R., Sanchez-Briñas, B. y Mantecón, A.R. 633

Calidad de los productos: Caracterización de Productos

- COMPOSICIÓN DE LOS ADITIVOS EN EMBUTIDO FERMENTADO PORTUGUÉS (CHOURIÇO) DESPUES DEL SECADO. Pires, P., Araújo, J.P., Barros, M., Fernandes, E., Cerqueira, J., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U. y Dias, T. 636
- CONTAMINACIÓN POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN EL PROCESAMIENTO DE UN EMBUTIDO FERMENTADO PORTUGUÉS (*LINGUIÇA*). Cadavez, V., Pereira, A. P., Gomes, A., Silva, F., Estevinho, L., Gonzales-Barron, U., y Dias, T. 639
- EVALUACIÓN DE LA HIGIENE E INOCUIDAD DE UN EMBUTIDO FERMENTADO PORTUGUÉS (*LINGUIÇA*) A LO LARGO DE SU PROCESAMIENTO. Gonzales-Barron, U., Pereira, A. P., Gomes, A., Silva, F., Rodrigues, P., Fernandes, C., Estevinho, L., Cadavez, V., y Dias, T. 642
- CARACTERIZACIÓN DE LA CARNE DE CABALLO: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS. Belaunzaran, X., Lavín, P., Mantecón, A.R. y Aldai, N. 645
- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA CARNE DE CORDERO COMERCIALIZADA EN LA COMUNIDAD AUTONOMA DEL PAÍS VASCO Y NAVARRA. Bravo-Lamas, L., Barron, L.J.R., Etaio, I. y Aldai, N. 648
- CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE LOS QUESOS DE MADRID. DIFERENCIAS EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL Y UTILIDAD DEL ANÁLISIS SENSORIAL PARA LA DESCRIPCIÓN DE LAS PROPIEDADES DE TEXTURA DE LOS QUESOS. Miguel, E., Álvarez-Teno, A, Iriondo de Hond, M. y Mancho, C. 651
- CORRELACIONES ENTRE VARIABLES SENSORIALES E INSTRUMENTALES Y DE COMPOSICIÓN QUÍMICA EN QUESOS DE LA COMUNIDAD DE MADRID. Miguel, E., Álvarez-Teno, A., Iriondo de Hond, M. y Mancho, C. 654

Calidad de los productos: Envasado y consumidores

- EFECTO DE LA CATEGORÍA COMERCIAL Y DEL TIEMPO DE MADURACIÓN EN VACÍO SOBRE LA CALIDAD INSTRUMENTAL DEL LOMO DE RAZA DUROC. Álvarez-Rodríguez, J., Villagrasa, L., Ros-Freixedes, R., Gol, S., Henríquez, E., Pena, R., Estany, J. y Tor, M. 657
- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LA VIDA ÚTIL DE CHULETAS DE PIERNA DE TERNASCO ENVASADAS EN VACÍO “SKIN”. Bellés, M., Alonso, V., Calanche, J. B., Roncalés, P. y Beltrán, J. A. 660
- EFECTO DE LA PRESENCIA DE HEMATOMAS EN LA EVOLUCIÓN DEL pH Y AMINAS BIOGÉNICAS DE ACUERDO CON EL MÉTODO DE ENVASADO Y EL TIEMPO DE MADURACION EN CARNE VACUNA. Cruz-Monterrosa, R.G., Rayas-Amor, A.A. y Miranda-de la Lama, G.C. 663
- ANÁLISIS DE PREFERENCIAS DE LA CARNE DE OVINO ENVASADA AL VACÍO. Maza, M.T., Saied, M. y Gracia, A. 666
- APARIENCIA, INFORMACIÓN SOBRE INGREDIENTES Y PRECIO EN LA DECISIÓN DE COMPRA DE JAMÓN COCIDO. Resconi, V.C., Barahona, M., Keenan, D.F., Guerrero, L. y Hamill, R.M. 669
- EFECTO DE LA DIETA, ENVASE Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE LA APRECIACIÓN VISUAL Y LA INTENCIÓN DE COMPRA DE LA CARNE DE CERDO DE TERUEL CON I.G.P. Panea, B., Ripoll, G. y Albertí, P. 672

Calidad de los productos: Dieta (I)

- EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE OLEÍNA DE GIRASOL EN LA DIETA DE EN CORDEROS EN FASE DE CRECIMIENTO-CEBO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA CARNE. Blanco, C., Giráldez, F.J., Andrés, S., Morán, L., Tejido, M.L., López, S. y Bodas, R. 675
- LOS NIVELES DE ÁCIDO RUMÉNICO Y ÁCIDO VACÉNICO DE LA GRASA INTRAMUSCULAR DE LOS LECHAZOS AUMENTAN AL INCORPORAR ORUJO DE UVA EN LA RACIÓN DE LAS OVEJAS. Guerra-Rivas, C., Gallardo, B., Lavín, P., Mantecón, A.R., Vieira, C. y Manso, T. 678
- LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA CARNE DE LECHAZO SE INCREMENTA A LO LARGO DE SU ALMACENAMIENTO AL INCORPORAR ORUJO DE UVA EN LA RACIÓN DE LAS OVEJAS. Guerra-Rivas, C., Vieira, C., Gallardo, B., Mantecón, A.R., Lavín, P. y Manso, T. 681
- SEMILLA DE COLZA PARA OVEJAS EN ORDEÑO: EFECTO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE. Delgado, D., Asensio-Vegas, C., Tabernero de Paz, M.J., Rodríguez, L. y Bodas, R. 684
- INFLUENCIA DEL EXTRACTO DE PIEL DE CACAHUETE SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA HAMBURGUESA DE OVEJA ENVASADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA. Munekata, P.E., Fernandes, R. de P.P., Trindade, M.A., de Melo, M.P. y Lorenzo, J.M. 687
- INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SUBPRODUCTO DE TOMATE SOBRE EL CRECIMIENTO Y CALIDAD DE CARNE EN CORDEROS MERINOS. López-Parra, M.M., Muñoz-Regalado, B., Timón, M.L., Petró, M.J., Andrés, A.I. y Delgado-Adámez, J. 690
- EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PULPA DE TOMATE EN ENSILADO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA CARNE DE CORDEROS. Sánchez-Baltasar, R., López-Parra, M.M. y Muñoz-Regalado, B. 693

Calidad de los productos: Dieta (II)

- EFECTO DE LA APLICACIÓN DE SUBPRODUCTOS INDUSTRIALES DE TOMATE (SIT) SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE CARNE DE CORDERO. Timón, M.L., Petró, M.J., Muñoz-Regalado, B., López-Parra, M.M. y Andrés, A.I. 696
- EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE ACEITE DE LINAZA Y VITAMINA E EN LA DIETA DE LAS OVEJAS CHURRAS SOBRE EL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN LA LECHE Y EN LA CARNE DE LECHAZO. Gallardo, B., Guerra-Rivas, C., Mantecón, A.R., Manca, M.G., Nudda, A. y Manso, T. 699
- MODIFICACION DE LA CALIDAD DE LA CARNE DE POLLO DE PRODUCCION ECOLÓGICA DEBIDA A LA ADICION DE MOLTURA DE AJO (ZooAllium®). Revilla, I., Martín, P., Miralles, A., Otal, J., Palacios, C., Alvarez, S., León, L. y Cubero, M.J. . . . 702
- EFECTO DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE UVA SOBRE EL COLOR, LAS PROPIEDADES SENSORIALES Y LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE CARNE DE VACUNO ENRIQUECIDA CON CLA. Gómez, I., Mendizábal, J.A., Marin, R., Sarries, M.V., Insausti, K., García, S., Ruiz, M., Purroy, A. y Beriain, M. J. 705
- EFECTO DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN, MÚSCULO Y ENVASADO SOBRE LA OXIDACIÓN Y LA EVOLUCIÓN DEL COLOR DE LA CARNE EN LA RAZA AVILEÑANA-NEGRA IBÉRICA. Barahona, M., Olleta, J. L., Hachemi, M.A., Sañudo, C., González, M.M. y Campo, M.M. 708

- INFLUENCIA DEL SISTEMA DE ALIMENTACIÓN EN EL CEBO SOBRE LA TEXTURA DE LA CARNE DENTRO DE LA IGP CARNE DE ÁVILA. Hachemi, M.A., Campo, M.M., Barahona, M., Sañudo, C., López, J. y Olleta, J.L. 711

Calidad de los productos: Tecnología

- EFECTO DEL TIEMPO DE CONGELACIÓN SOBRE LAS PÉRDIDAS DE AGUA Y TEXTURA INSTRUMENTAL DEL SOLOMILLO Y SECRETO DEL CERDO IBÉRICO DE BELLOTA. García-Torres, S., Pérez-Blázquez, M., Tejerina, D., Martín-Tornero, E., Cabeza de Vaca, M., López-Gajardo, A., Osorio, C. y Prior, E. 714
- ESTABILIDAD OXIDATIVA Y MICROBIOLÓGICA DE CARNE DE CERDO ENVASADA EN ATMÓSFERA PROTECTORA PREVIA CONGELACIÓN DURANTE UN AÑO. Alonso, V., Bellés, M., Calanche, J. B., Roncalés, P. y Beltrán, J.A. 717
- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ALTAS PRESIONES Y/O EL MARINADO EN SALES DE CALCIO EN LA TEXTURA Y EL COLOR DE CARNE DE AÑOJO. Albertí, P., Panea, B., Albertí C. y Ripoll, G. 720

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Abad, R.	284, 287	Añó, P.	260
Abad-Guamán, R.	275, 278	Arana, A.	453, 456
Abecia, J.A.	396, 399	Araújo, J.P.	48, 78, 105, 108, 111, 636
Abecia, L.	137, 215, 233	Arco-Pérez, A.	194, 215
Abril-Sánchez, S.	358	Argente, M.J.	543
Aceituno, O.	173	Argüello, A.	624, 627
Agha, S.	555	Arias, M.S.	182, 185, 188
Aguayo-Ulloa, A.	63	Arias, R.	75, 585
Agudo, B.	173	Arias-Álvarez, M.	352, 426, 429, 432
Aguilar, D.	420	Arranz, J.J.	462, 471, 474
Aguilera, J.F.	323, 320	Arrébola, F.	399
Aguiló, J.	227	Arregui, L.	384
Al Alami, A.	221	Arroyo, F.L.	182, 185, 188
Alabart, J.L.	402, 444, 447, 498	Asensio-Vegas, C.	684
Albanell, E.	149, 179, 230	Astiz, S.	96
Albertí, C.	720	Atlija, M.	471
Albertí, P.	618, 624, 627, 672, 720	Atxaerandio, R.	269, 272
Alcalde, M.J.	624, 627	Aymerich, P.	296
Aldai, N.	633, 645, 648	Ayuso, M.	468
Alenda, R.	531	Azqueta-Oyarzun, D.	114
Alfonso, C.	281	Babot, D.	90, 146, 326
Alfonso, L.	456	Bach, A.	242
Aligue, R.	260	Badawy, A.Y.	549
Almeida, J.C.	48, 111	Ballester, M.	480, 492
Almería, S.	414	Barragán, C.	477, 486, 570, 579
Alonso, V.	660, 717	Barrantes, O.	99, 117
Altarriba, J.	495, 522, 561, 564	Batista, A.C.S.	48, 111
Álvarez, R.	624	Balcells, J.	146, 200, 326
Álvarez, S.	266, 702, 337	Barahona, M.	669, 708, 711
Álvarez-Rodríguez, J.	90, 326, 600, 657, 146	Barba-Vidal, E.	191
Álvarez-Teno, A.	651, 654	Baro, J.A.	522, 561
Alves, E.	465	Barron, L.J.R.	648
Alvir, M.D.	203, 206	Barros, M.	636
Amanzougarene, Z.	212	Baucells, Q.	96
Amills, M.	459, 573	Belaunzaran, X.	645
Amor, J.	161	Belenguer, A.	140, 155
Andrés, A.I.	690, 696	Bellés, M.	660, 717
Andrés, S.	176, 675	Beltrán, J.A.	660, 717
Ángeles, A.A.	299	Benítez, F.	399
		Benítez, R.	468, 486, 579

AUTORES	Páginas
Beriain, M.J.	621, 705
Bermejo-Poza, R.	429, 588
Blanch, E.	367
Blanco, C.	176, 675
Blanco, M.	36, 164, 167, 170
Blanco-Penedo, I.	105, 108
Blasco, A.	543, 546, 549, 552, 555
Blasco, I.	99, 117
Bodas, R.	224, 675, 684
Bodin, L.	498
Bonilla, R.	182, 185
Bowman, P.J.	519
Braganca, R.	143
Bravo-Lamas, L.	648
Brito, M.C.	343
Caballero, M.	302
Cabeza de Vaca, M.	597, 714
Cabeza-Luna, I.	131
Cabezón, O.	414
Cadavez, V.	84, 606, 636, 639, 642
Cadavez, V.A.P.	609
Caja, G.	149, 179, 227, 230
Calanche, J.B.	660, 717
Calle, E.W.	543, 546
Calsamiglia, S.	96, 251, 254
Calvo, J.H.	444
Cambra-López, M.	260
Campo, J.L.	405, 489, 513
Campo, M.M.	708, 711
Campos, J.L.	408
Canela, O.	459
Canha, A.	438
Cánovas, A.	254, 459, 468
Cantalapiedra, J.	78, 105, 108
Cantero, V.	597
Canudas, E.	158
Cañas-Álvarez, J.J.	522, 561
Carabaño, M.J.	534
Carabaño, R.	275, 278, 284, 287

AUTORES	Páginas
Cardoso, T.	459
Carreño, D.	152, 155, 161
Carril, J.A.	630
Carro, M.D.	131, 134, 203, 206, 275, 278
Casao, A.	378, 420
Casares-Crespo, L.	361, 367, 373
Casasús, I.	36, 218, 331
Casellas, J.	42, 516, 576
Castañeda, A.	370
Castaño, C.	405, 408
Castillejos, L.	96, 191, 314, 317
Castillo, M.	516
Castrillo, B.	594
Castrillo, C.	221
Castro-Carrera, T.	140, 152, 155
Castro-Costa, A.	227
Català, M.G.	441
Cava, R.	597
Cazapal-Monteiro, C.	185
Cebrián-Pérez, J.A.	378, 420
Celaya, R.	33, 45
Cerisuelo, A.	260
Cerqueira, J.	636
Cerqueira, J.L.	78
Cerqueira, J.O.	48
Cerqueira, J.O.L.	105, 108, 111
Cervantes, I.	558
Cervantes, P.	158
Charfeddine, N.	525, 528
Chaso, M.A.	173
Chemineau, P.	393, 396
Chitneedi, P.K.	471
Chomón, N.	594
Cimadevilla, C.	594
Cocero, M.J.	444
Coelho Filho, R.C.	123
Collantes-Fernández, E.	411
Coloma, M.A.	405
Contador, R.	597
Contreras, I.	441
Contreras-Jodar, A.	149
Córdoba, M.G.	624, 627

AUTORES	Páginas
Cordón, L.	149
Cortés, X.	36, 200
Cortiñas, F.J.	188
Coy, P.	387, 438
Creevey, C.	137
Crespo, R.	281
Crespo-Félez, I.	370, 384
Crespo-Piazuelo, D.	492
Cruz-Monterrosa, R.G.	663
Cuartelles, I.	117
Cubero, M.J.	266, 702
Dachraoui, M.	248
Daetwyler, H.D.	519
Darwich, L.	414
David, I.	498
Dávila, S.G.	408, 489, 513
Daza, A.	27, 334, 417, 390
De Gasperín, I.	158, 299
De la Fuente, G.	143, 146, 209
De la Fuente, J.	588
De Lucas, J.	149
De Melo, M.P.	687
De Mercado, E.	305, 308, 311
De Pedro Sanz, E.	603
De Vega, A.	221
Delgadillo, J.A.	393, 396
Delgado, D.	684
Delgado, R.	284, 287
Delgado-Adámez, J.	690
Devant, M.	239, 242
Dias, T.	636, 639, 642
Díaz, C.	522, 534, 561
Díaz, M.T.	588
Díaz Buenestado, C.	21
Diego, R.	364
Diéguez, F.J.	257
Dolz, N.	90, 326
Domínguez, M.	24
Domínguez, R.	630
Duarte, G.	393, 396
Durão, L.	84
Echegoyen, E.	402, 444, 447
Egbalsaid, S.	573

AUTORES	Páginas
Escribano, M.	51, 57, 60
Estany, J.	483, 507, 540, 600, 657
Esteban-Blanco, C.	474
Esteso, M.C.	408
Estévez-Moreno, L.X.	120
Estevinho, L.	639, 642
Estrada F.J.	120
Etaio, I.	648
Fabà, Ll.	290, 302
Fajardo, A.	367
Fathallah, S.	498
Fantova, E.	117, 444, 498
Faria, F.C.	105, 108
Farinós, B.	260
Febrel, N.	432
Fernandes, C.	642
Fernandes, E.	636
Fernandes, R. de P.P.	687
Fernandes, S.	48
Fernández, A.	468, 486, 579
Fernández, A.I.	465, 468, 492, 579
Fernández, I.G.	393
Fernández, J.	87, 537, 567
Fernández, M.	152, 630
Fernández, N.	93
Fernández, P.	176
Fernández-Novales, J.	603
Fernández-Santos, M.R.	501
Fernández-Yepes, J.	131
Ferreira, L.M.M.	45
Ferrer, J.	170
Ferrer, P.	260
Ferret, A.	245
Fina, M.	42
Fitz-Rodríguez, G.	393
Flores, J.A.	393, 396
Folch, J.	402, 444, 447, 465, 480, 492
Fondevila, M.	212, 221, 293
Fontes, I.	111
Forcada, F.	90, 396

AUTORES	Páginas
Formoso-Rafferty, N.	429, 558
Fouz, R.	257
Francisco, I.	188
Francisco, R.	182
Franco, D.	630
Franco-Rosselló, R.	263
Frutos, P.	140, 152, 155, 161
Gadea, J.	387
Galé, I.	390, 417
Gallardo, B.	678, 681, 699
Gallardo, D.	254
Gallego, R.	75
García, F.	477, 579
García, G.	173
García, J.	275, 278, 284, 287
García, M.L.	543
García, S.	54, 705
García, U.	45
García, W.	349, 423
García-Álvarez, O.	501
García Álvarez-Coque, JM.	126
García Cortes, L.A.	87, 567
García-García, J.J.	224
García-García, R.M.	352, 426, 429, 432
García-Ispierto, I.	414
García-Martínez, S.	438
García-Prieto, V.	33
García-Rodríguez, A.	269, 272
García-Ruíz, A.I.	281
García-Torres, S.	597, 714
García-Vázquez, F.A.	358, 435
Garde, J.J.	501
Garnica, F.P.	343
Garrido Varo, A.	603
Gasa, J.	81, 290, 296, 302, 314, 317
Gaspar, E.	420
Gaspar, P.	51, 57, 60
Gil, M.G.	408, 489, 513
Giménez, I.	367

AUTORES	Páginas
Gimeno, A.	221
Giráldez, F.J.	176, 675
Goddard, M.E.	519
Gol, S.	483, 600, 657
Gomes, A.	639, 642
Gómez, E.A.	93, 367, 260
Gómez, F.	24
Gómez, I.	621, 705
Gómez, W.D.	120
Gómez Cabrera, A.	21, 39
Gómez-Fernández, J.	305, 308, 311
Gómez-Izquierdo, E.	305, 308, 311
Gómez Raya, L.	87, 570
Gómez Rodríguez, J.	39
Gonzales-Barron, U.	606, 609, 636, 642
González, E.P.	176
González, J.	203, 206
González, J.S.	161
González, L.A.	245
González, M.G.	69, 72
González, M.M.	708
González-Arto, M.	420
González-Casquet, O.	399
González de Chavarri, E.	588
González-Luna, S.	149
González-Prendes, R.	459
González-Bulnes, A.	468
González-Recio, O.	519, 528
González-Rodríguez, A.	495, 522, 561, 564
Gosálvez, J.	376, 381
Gracia, A.	666
Grandía, J.	390, 417
Guedes, C.	48, 111
Guerra-Rivas, C.	678, 681, 699
Guerrero, J.E.	603
Guerrero, L.	669
Guillamón, E.	305, 308, 311
Gutiérrez, J.P.	558
Gutiérrez-Gil, B.	462, 471, 474
Gutiérrez-Peña, R.	54
Hachemi, M.A.	708, 711

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Hamdi, M.	263	Lahoz, B.	444, 447, 498
Hamill, R.M.	669	Lara, L.	323, 320
Hamilton, RST.	420	Larrán, A.M.	87
Hamzaoui, S.	230	Larrea-Dávalos J.A.	278
Haro, A.	323, 320	Latorre, M.A.	293
Hayes, B.J.	519	Lauzurica, S.	588
Henríquez, E.	600, 522	Lavín, P.	69, 72, 633, 645, 678, 681
Hernández, H.	393, 396	Laviña, A.	378
Hernández, J.A.	182, 185, 188	León, L.	266, 702
Hernández, M.	444	Limas, A.G.	197
Hernández, P.	552, 555	Lobón, S.	164, 167, 170
Hernández-Meléndez, J.	197	Loeza, R.	158, 299
Hervás, G.	140, 152, 155, 161	López, C.	99
Horrillo, A.	51	López, F.	173
Humada, M.J.	594	López, J.	711
Hurtado, A.	272	López, S.	675
Ibáñez, N.	465	López-Aguirre, D.	197
Ibáñez-Escriche, N.	504, 507, 558	López-Bote, C.J.	158, 299, 468
Iglesias, A.	630	López-Fernández, C.	376
Insausti, K.	621, 705	López-Gajardo, A.	597, 714
Iriondo de Hond, M.	651, 654	López Gallego, F.	236
Isabel, B.	158, 299, 468	López-Gatius, F.	346, 414
Izaquirre, M.	390, 417	López-Helguera, I.	346, 414
Izquierdo, D.	441	López-López, C.	45
Jaramillo, E.	176	López-Nuez, P.	305, 308, 311
Jaroso, R.	633	López-Paredes, J.	531
Jiménez, E.	233	López-Parra, M.M.	690, 693, 696
Jiménez, L.	75, 585	López-Sebastián, A.	405, 408
Jiménez-Calderón, J.D.	248, 340	López-Tello, J.	426, 429, 432
Jiménez-Hernando, M.A.	498	López-Úbeda, R.	364
Jiménez-Montero, J.A.	528	López-Vergé, S.	81, 302
Jiménez-Rabadán, P.	501	Lorenzo, J.M.	630, 687
Jones, E.	209	Lorenzo, P.L.	352, 426, 429, 432
Jones, S.	209	Macías, A.	378
Joven, M.	293	MacLeod, I.M.	519
Joy, M.	164, 167, 170	Madruga, A.	245
Jurado, J.J.	444, 498	Mainau, E.	245
Juste, V.	552, 555	Manca, M.G.	699
Keenan, D.F.	669	Mancho, C.	651, 654
Keller, M.	393	Manrique, E.	66, 117
Kleinman-Ruiz, D.	567	Manso, T.	678, 681, 699
Ladero, L.	597		

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Manteca, X.	245	Miguel, E.	612, 615, 651, 654
Mantecón, A.R.	69, 72, 633, 645, 678, 681, 699	Miguélez, S.	182, 185, 188
Manuelian, C.L.	179	Millán, P.	432
Manunza, A.	573	Mínguez, C.	343
Marco, M.	281	Miralles, A.	266, 702
María, G.A.	63	Miranda-de la Lama, G.C.	63, 591, 663
Marín, R.	705	Mocé, E.	367
Marín, S.	423	Molina, A.	522, 534, 561
Maroto Molina, F.	21, 39	Molina-Alcaide, E.	131, 134
Maroto-Morales, A.	501	Molino, F.	164, 170
Marques, A.	84	Moll, X.	227
Marques, R.	78, 260	Mondéjar, I.	387
Martín, M.	305, 308, 311	Montiel, F.	299
Martín, P.	266, 702	Montoro, V.	75
Martin-García, A.I.	137, 194, 215, 233	Mora, J.	200
Martín-Orúe, S.M.	191	Morán, L.	675
Martín-Tornero, E.	597, 714	Morazán, H.J.	146
Martínez, A.	33, 45	Moreno, C.	495, 522, 564
Martínez, A.M.	480	Moreno, J.A.	191
Martínez, J.M.	158	Moreno-Gonzalo, J.	411
Martínez-Álvaro, M.	552, 555	Morrell, J.	370
Martínez Blánquez, M.	21	Mouresan, E.F.	495, 522, 561, 564
Martínez del Pino, L.	456	Mozo, R.	402, 444
Martínez-Fernández, A.	102, 248, 340	Muiño-Blanco, T.	378, 420
Martínez-Fernández, G.	233	Muller, A.	609
Martínez-Montes, A.M.	465	Munekata, P.E.	687
Martínez-Pastor, F.	370, 384	Munilla, S.	495, 522, 561, 564
Masache, J.L.	343	Muñoz, G.	486
Masdeu, M.	352	Muñoz-Regalado, B.	690, 693, 696
Masembe, C.	573	Mur, R.	346
Mata-Campuzano, M.	370, 384	Mur-Novales, R.	414
Matás, C.	358, 364, 435	Muzquiz, M.	305, 308, 311
Mateos, I.	134	Nava-Bernal, G.	120
Maza, M.T.	666	Navarro, M.A.	402
Medrano, J.F.	468, 516	Navarro-Lozano, V.	411
Mena, Y.	54	Nesme, T.	99
Mendizábal, J.A.	453, 456, 705	Newbold, C.J.	137, 143, 209
Menoyo, D.	284, 287	Nicodemus, N.	281, 284, 287
Mercadé, A.	573	Nicoloso, C.S.	117, 123
Mesías, F.J.	51, 57, 60	Nieto, R.	323, 320
Micheo, J.M.	54		

AUTORES	Páginas
Noce, A.	573
Noguera, J.L.	504
Nudda, A.	699
Núñez, Y.	468, 477, 486, 579
Ocasio-Vega, C.E.	278
Olaizola, A.	24, 99
Olaizola, A.M.	66, 117
Oliete, B.	75, 585
Olivera, J.	444
Olleta, J.L.	708, 711
Onega, E.	612, 615
Orriols, M.	42
Ortega-Mora, L.M.	411
Orús, A.	349
Osorio, C.	597, 714
Osoro, K.	33, 45, 411
Osuagwuh, U.	349, 423
Otal, J.	266, 702
Óvilo, C.	468, 486, 579
Paço, S.M.	105, 108
Palacín, I.	355
Palacios, C.	266, 337, 399, 702
Palma-Granados, P.	323, 320
Palomo, M.J.	349, 423
Panea, B.	618, 624, 627, 672, 720
Pantrigo, M.	326
Paramio, M.T.	441
Pardal, S.	370, 384
Parera, J.	326
Pascual, J.J.	260
Pascual, M.	546
Pascual, M.R.	173
Pascual-Alonso, M.	63
Paz Silva, A.	182, 185, 188
Peiró, R.	549
Pena, R.N.	483, 540, 600, 657
Pereira, A.P.	639, 642
Pérez, C.	588
Pérez, J.F.	263

AUTORES	Páginas
Pérez, M.	597
Pérez-Baena, I.	93
Pérez-Blázquez, M.	714
Pérez-Cabal, M.A.	525
Pérez-Guzmán, M.D.	75, 501, 534, 585
Pérez-Marín, D.	603
Pérez-Montarelo, D.	465
Pérez-Pé, R.	378, 420
Peris, C.	93
Petrón, M.J.	690, 696
Piedrafita, J.	42, 522, 561
Piles, M.	507, 510
Pindado, E.	126
Pineda-Quiroga, C.	269, 272
Pinedo, J.	87
Pinloche, E.	137
Piñeiro, P.	185
Pires, P.	636
Pires, S.	84
Poindron, P.	393
Popova, T.	606
Posado, R.	224
Prior, E.	597, 714
Pryce, J.E.	519
Puig-Oliveras, A.	480, 492
Pulido, A.F.	60
Pulido, F.	51
Purroy, A.	453, 705
Quadros, F.L.F.	123
Quintanilla, R.	459, 507
Quintín, F.	444
Radu, C.	170
Rafel, O.	510
Ragab, M.	510
Ramón, J.	444, 510
Ramón, M.	501, 534
Ramos-Morales, E.	143, 194, 215, 233
Ranilla, M.J.	134
Rauw, W.M.	87
Rayas-Amor, A.A.	663
Rebollar, P.G.	352, 426, 429, 432

AUTORES	Páginas	AUTORES	Páginas
Regan, J.	99	Ruiz, M.	621, 705
Reiné, R.	99, 117	Ruiz, R.	269, 272
Reixach, J.	507	Ruiz de Huidobro, F. ...	612, 615
Resano, H.	24	Ruiz de la Torre, J.L. ...	245
Resconi, V.C.	669	Sagbay, C.	343
Resino-Talaván, P.	489	Sahelices, A.	57
Revilla, I.	266, 702	Saied, M.	666
Revilla, M.	480, 492	Saiz, A.	281
Revilla, R.	36	Salaet, I.	260
Rey, A.I.	468	Salama, A.A.K.	149, 227, 230
Riaguas, L.	117	Salem, A.Z.M.	197
Rigau, T.	42	Sánchez, A.	573
Ripoll, G.	164, 167, 618, 624, 627, 672, 720	Sánchez, J.P.	507, 510
Rivas, E.	402	Sánchez, M.	126
Rivero, M.	191	Sánchez, P.	444, 447
Rodrigues, P.	642	Sánchez-Andrade, R. ..	182, 185, 188
Rodríguez, C.	465, 570, 579	Sánchez-Baltasar, R. ..	693
Rodríguez, L.	684	Sánchez-Briñas, B.	633
Rodríguez, M.	93, 426, 429, 432	Sánchez-Espada, A.I. .	381
Rodríguez, M.C.	477, 486	Sánchez-Nadal, J.A. ...	355
Rodríguez, P.L.	173	Sánchez-Ocaña, A.	337
Rodríguez-Gil, J.E.	42	Sánchez-Rodríguez, A.	352
Rodríguez-Ledesma, A.	60	Sánchez-Rodríguez, M.	534
Rodríguez Medina, P.L.	236	Sánchez-Sánchez, R. .	411
Rodríguez Meilán, J. ...	236	Sánchez-Vera, E.	120
Rodríguez-Prado, M. ...	245	Sanchís, J.	182, 185
Rodríguez-Ramilo, S.T.	567	Sanjuán, M.L.	257
Rodríguez-Sánchez, J.A.	218, 331	Sansano, S.	367
Rojo, R.	197	Santacreu, M.A.	549
Rojo-Montejo, S.	411	Santiago, C.	102
Román-Trufero, A.	33, 411	Santiago-Moreno, J.	405, 408
Romar, R.	438	Santolaria, P.	355, 376
Romasanta, A.	188	Santos, V.	48, 111
Romero, M.P.	591	Santos Alcudia, R.	21, 39
Roncalés, P.	660, 717	Sanz, A.	36, 164, 167, 170, 218, 331
Ros-Freixedes, R.	483, 540, 600, 657	Sañudo, C.	708, 711
Rothschild, M.F.	483, 507	Saro, C.	134
Roura, M.	441	Sarriés, M.V.	621, 705
Rovai, M.	179	Schauf, S.	212, 221
Roy, R.	381	Sedó, F.	200
		Seiquer, I.	323, 320
		Sepúlveda, W.S.	63

AUTORES	Páginas
Serradilla, J.M.	534
Seradj, A.R.	146, 200
Serrano, E.	24, 594
Serrano, M.	381, 534
Serrano-Pérez, B.	346, 414
Sevilla, E.	444
Silió, L.	465, 477, 486, 570, 579
Silva, F.	639, 642
Silva, S.R.	48, 111
Silveira, V.CP.	123
Siurana, A.	251, 254
Sol, C.	314, 317
Solà-Oriol, D.	81, 263, 290, 296, 302
Solé, A.	242
Soler, A.J.	501
Sonesson, A.K.	537
Soret, B.	453, 456
Soriano-Úbeda, C.	358, 435
Soto, S.	441
Suárez, J.L.	188
Suárez-Belloch, J.	293
Suárez-Vega, A.	462
Such, X.	149, 230
Tabárez, A.	349, 423
Tabernero de Paz, M.J.	224, 684
Talaván, A.M.	361, 373
Tamayo, K.	600
Tamayo, S.	600
Tavares, T.	78
Tejerina, D.	597, 714
Tejido, M.L.	176, 675
Terré, M.	242
Timón, M.L.	690, 696
Toledano-Díaz, A.	405, 408
Tomás, C.	87, 305, 308, 311, 367
Tor, M.	483, 540, 600, 657
Toral, P.G.	140, 152, 155, 161

AUTORES	Páginas
Toro, M.A.	87, 537, 567
Torrent, F.	588
Torres, O.	408
Trindade, M.A.	687
Tudela, L.	126
Tuono, T.	346
Urrutia, O.	453, 456
Vanegas, J.L.	203, 206, 278
Varela, A.	305, 308, 311
Varona, L.	495, 522, 561, 564
Vázquez, I.	24
Vázquez-Armijo, J.F.	197
Vázquez-Briz, S.	93
Velasco, B.	426, 432
Velázquez, F.	158, 299
Velázquez, R.	408
Ventós, A.	349
Verdu, M.	239
Vicente, J.G.	158, 299
Vicente, F.	102, 248, 340
Vicente-Amores, F.M.	30, 114
Vicente-Fiel, S.	355
Vieira, C.	678, 681
Vielma, J.	393
Vilaró, F.	600
Villagrasa, L.	657
Villalba, D.	36, 200
Villamediana, R.	69, 72
Villanueva, B.	537, 567
Villarroel, M.	87, 588
Viña, C.	257
Viudes-de-Castro, M.P.	361, 373
Webster, P.G.	343
Xavier, C.	609
Yáñez-Ruiz, D.R.	137, 194, 215, 233
Yániz, J.L.	355, 376
Yus, E.	257
Zamudio, B.A.	66
Zubiria, I.	272

Reproducción

ENTRADA EN PUBERTAD Y FERTILIDAD DE NOVILLAS PARDA DE MONTAÑA Y PIRENAICA SOMETIDAS A DISTINTOS RITMOS DE CRECIMIENTO DURANTE LA RECRÍA

Rodríguez-Sánchez, J.A., Sanz, A., Ferrer J., Casasús, I.
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón.
Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. jarodriguezs@aragon.es

INTRODUCCIÓN

En España, según datos oficiales del MAGRAMA (2014), en torno al 50% de las novillas tienen su primer parto con más de tres años. Esto es debido, en parte, a la creencia de que un primer parto más temprano tiene consecuencias negativas tanto para el crecimiento de la novilla como para su futuro rendimiento productivo y reproductivo. Sin embargo, sería necesario adelantar el primer parto para reducir el tiempo improductivo de las vacas, puesto que la productividad en vacuno de carne depende en gran medida de su vida útil. Ésta comienza con el inicio de la pubertad, que depende tanto de factores genéticos, como la raza (siendo las razas cárnicas menos precoces que las lecheras) como ambientales (especialmente la nutrición, que condiciona el crecimiento). Desde el destete hasta la primera cubrición (periodo de recría) las novillas deberían tener un manejo nutricional diferente al resto del rebaño, que les permita llegar púberes al inicio de la época de cubrición, para mejorar su fertilidad en la primera cubrición y adelantar así el primer parto. El objetivo de este ensayo fue analizar el efecto de dos ritmos de crecimiento durante la recría (0,7 vs. 1,0 kg/d), así como el efecto de la raza (Parda de Montaña vs. Pirenaica), sobre la entrada en pubertad y la fertilidad obtenida con inseminación artificial a tiempo fijo a los 15 meses de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 13 terneras de raza Parda de Montaña (Parda) y 12 de raza Pirenaica nacidas en otoño de 2010. El ensayo se desarrolló en las instalaciones del CITA en Montañana (Zaragoza) desde el destete de las terneras (6 meses) hasta el final de la época de cubrición (18 meses). Durante la fase de lactación previa al ensayo todas las terneras se alimentaron de la leche de sus madres y de un preparado comercial de arranque suministrado *ad libitum*. Este manejo permitió a las terneras tener una ganancia media diaria (GMD) de $1,036 \pm 0,073$ kg, con la que se alcanzó un peso vivo (PV) al destete similar en ambas razas (247,1 vs. 228,8 kg PV en Parda y Pirenaica, respectivamente, NS). Las terneras de cada raza se dividieron en dos lotes homogéneos en PV para aplicar dos objetivos de crecimiento (0,7 vs. 1,0 kg/d para Bajo y Alto, respectivamente) a lo largo de los nueve meses de recría (6-15 meses) (lotes: Parda-Bajo, Parda-Alto, Pirenaica-Bajo y Pirenaica-Alto). Durante el ensayo, todas las novillas recibieron heno de alfalfa *ad libitum* y, para conseguir el crecimiento objetivo, 6 y 12 g de pienso de crecimiento/kg PV para los lotes Bajo y Alto, respectivamente.

Las novillas se pesaron semanalmente durante todo el ensayo y la GMD se estimó por regresión lineal del peso sobre la fecha. Se tomaron muestras semanales de sangre para determinar la concentración plasmática de progesterona mediante ensayo inmunoenzimático (Ridgeway Science, Reino Unido) y así estimar el inicio de pubertad. Se consideró que una novilla entraba en pubertad cuando su nivel de progesterona en sangre era superior a 1 ng/ml en dos muestras consecutivas.

A los 15 meses se inició una sincronización de celos mediante una combinación de progestágenos (espiral intravaginal: PRID; CEVA, España), GnRH (Busol; INVESA, España), prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Enzaprost, CEVA, España) y eCG (Foligon, MSD, España), para realizar 14 días más tarde a la inseminación artificial a tiempo fijo. A partir de esta inseminación, y durante los tres meses que duró la época de cubrición, se mantuvo una observación visual de las novillas dos veces al día para detectar el celo en las no fecundadas y proceder de nuevo a su inseminación. Un mes después de finalizar la época de cubrición se llevó a cabo un diagnóstico de gestación para determinar la fertilidad obtenida a lo largo de la cubrición.

Se realizaron análisis de varianza (PROC GLM) con los niveles de crecimiento establecidos durante la fase de recría, la raza y su interacción como efectos fijos, no siendo esta última significativa. Se presentan los valores medios de cada tratamiento, el error estándar de la

media (e.e.m.) y las diferencias entre medias establecidas mediante el test de Fisher ($P < 0,05$). La fertilidad se analizó mediante una prueba χ^2 (PROC FREQ).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se puede ver como el peso de las novillas al inicio de la pubertad no se vio significativamente afectado por la raza ni por el manejo al que fueron sometidas durante la recría (323 ± 38 kg PV), resultando un peso próximo a los descritos por Revilla et al. (1992) para ambas razas. Teniendo en cuenta que las dos razas presentan un peso adulto cercano a los 580 kg (Casasús et al., 2002), la pubertad se alcanzó con un 55,7% de este peso adulto. Estos resultados confirmarían que la pubertad se alcanza a un peso crítico (en torno al 55% del PV adulto) para cada raza (Freetly et al., 2011).

En el presente ensayo, la edad a la pubertad no estuvo significativamente influida por la GMD mostrada por las novillas desde el destete. Este resultado contrasta con estudios anteriores realizados por nuestro equipo (Rodríguez-Sánchez et al., 2013), en los que se encontró una influencia clara del crecimiento en recría sobre la edad de entrada en pubertad. Sin embargo, confirmarían otros estudios (Cardoso et al., 2014) que consideran menos relevante el crecimiento de las terneras tras el destete que el observado en la fase de lactación, que por el manejo seguido en este ensayo fue mayor que el habitual en ambas razas (Villalba et al., 2000).

La raza influyó significativamente en la edad a la pubertad (9,0 vs. 10,7 meses en Parda y Pirenaica respectivamente, $P < 0,05$), siendo más precoces las novillas de raza Parda que las Pirenaicas, como describieron Revilla et al. (1989) y Olleta et al. (1991), lo cual podría deberse al pasado lechero de las primeras como raza de doble aptitud. Dichos autores registraron unas edades a la pubertad muy superiores a las aquí descritas, posiblemente debido a un menor crecimiento tanto en lactación como en recría.

El 96% de las novillas se encontraban púberes 70 días antes del inicio del protocolo de sincronización (Tabla 1). De este modo, se cumplió ampliamente uno de los objetivos principales de la recría descrito por Gasser (2013), que las novillas estén púberes 30-45 días antes del inicio de la cubrición, puesto que se ha observado que la fertilidad aumenta hasta un 21% del primer al tercer celo de las novillas (Perry, 2012).

El peso a la primera inseminación estuvo influido por el manejo recibido durante la recría (413,9 vs. 467,2 kg PV, para Bajo y Alto, respectivamente, $P < 0,05$), aunque como se puede ver en la Tabla 1 estas diferencias fueron debidas al menor peso registrado por las novillas Pirenaica-Bajo respecto al resto de lotes. A pesar de que las novillas Pirenaica-Bajo eran más ligeras al inicio de la cubrición, la media de dicho lote superaba el 65% del peso adulto (377 kg en ambas razas) propuesto por Gasser (2013) como peso mínimo para que las novillas sean cubiertas. A medida que avanzó la época de cubrición, el lote Pirenaica-Bajo redujo las diferencias de peso con el resto de lotes y en el momento de la inseminación fecundante el peso de este lote sólo fue significativamente inferior al presentado por las novillas Parda-Alto.

Puesto que el protocolo de sincronización comenzó a los 15 meses en todos los lotes, la edad a la primera inseminación artificial fue similar en todos ellos. Al no haber diferencias significativas en el número de inseminaciones necesarias para alcanzar la gestación, la edad a la inseminación fecundante fue similar en todas las novillas.

La fertilidad (92%) no se vio afectada por el ritmo de crecimiento en recría ni por la raza, quedando sólo dos novillas vacías al final de la cubrición (una del lote Parda-Alto, otra del Pirenaica-Alto).

De estos resultados preliminares se puede concluir que las novillas de raza Parda fueron más precoces que las de raza Pirenaica, a pesar de que alcanzaron la pubertad con un peso similar. Si en lactación se aseguran ritmos de crecimiento cercanos a 1 kg/d, distintos ritmos de crecimiento en la recría no deberían influir en la edad de inicio de pubertad en ninguna de las dos razas. El número de inseminaciones necesarias y la fertilidad no se vieron afectadas por el ritmo de crecimiento impuesto durante la recría ni por la raza. Esto confirmaría que en ambas razas sería viable adelantar la primera cubrición a los 15 meses de edad. Este adelanto reduciría el periodo improductivo de las novillas y permitiría aumentar el número de terneros obtenidos por vaca a lo largo de su vida productiva. En todo caso, será necesario estudiar las repercusiones de este adelanto de la cubrición sobre el tamaño adulto que

alcancen las novillas y los posibles problemas de distocias, tanto en el primer parto como en los posteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Casasús et al., 2002. J. Anim. Sci. 80: 1638-1651. • Cardoso et al., 2014. J. Anim. Sci. 92:2942-2949. • Freetly et al., 2011. J. Anim. Sci. 89: 2373-2379. • Gasser, 2013. J. Anim. Sci. 84:3118-3122. • MAGRAMA, 2014. Estudio del sector español de vacas nodrizas (Datos SITRAN). • Olleta et al., 1991. ITEA Vol. Extra 11: 97-99. • Perry, 2012. J. Anim. Sci. 90: 1172-1182. • Revilla et al., 1989. ITEA Vol. Extra 9: 274-276. • Revilla et al., 1992. Bovis 46: 45-65. • Rodríguez-Sánchez et al. 2013. XV Jornadas de Prod. Anim. AIDA: 332-334. • Villalba et al., 2000. J. Anim. Sci. 78: 1132-1140.

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA 2010-57, RZP 2009-05 y RZP 2010-02). Los autores expresan su agradecimiento al personal del CITA (J.M. Acín, J. Casaus, M.A. Pueyo, N. Mladenov, E. León, E. Morago, P. Enfedaque, J. Pérez y P. Eseverri).

Tabla 1. Efecto del ritmo de crecimiento en recría y la raza sobre la entrada en pubertad y la fertilidad de novillas con inseminación artificial a tiempo fijo a 15 meses.

Raza	Parda		Pirenaica		e.e.m	Recría	Raza
	Bajo	Alto	Bajo	Alto			
Crecimiento en recría							
GMD, kg	0,893 ^a	1,101 ^a	0,622 ^b	1,032 ^a	0,09	**	NS
Peso a la pubertad, kg	335,3	307,0	315,6	334,1	15,68	NS	NS
Edad a la pubertad, m	9,7 ^{ab}	8,4 ^b	11,2 ^a	10,3 ^a	0,62	NS	*
% Peso Adulto	58	53	54	58	0,03	NS	NS
Peso 1 ^a IA, kg	438,7 ^{ab}	477,9 ^a	389,2 ^b	456,5 ^a	22,08	*	NS
Edad 1 ^a IA, m	15,7	15,7	15,8	15,8	0,14	NS	NS
Peso IA fecundante, kg	446,7 ^{ab}	484,8 ^a	394,0 ^b	458,2 ^{ab}	24,45	*	NS
Edad IA fecundante, m	16,6	16,5	16,5	16,2	0,38	NS	NS
nº IA necesarias	2,0	1,8	1,5	1,4	0,32	NS	NS
Fertilidad	6/6	6/7	6/6	5/6		NS	NS

NS: $P>0,05$; *: $P<0,05$; **: $P<0,01$

Letras distintas en una misma línea indican diferencias significativas ($P<0,05$)

Crecimientos esperados en recría: Bajo (0,7 kg/d); Alto (1,0 kg/d)

GMD: Ganancia Media Diaria desde el destete al inicio de la pubertad; IA: Inseminación Artificial

ONSET OF PUBERTY AND FERTILITY RATE IN PARDA DE MONTAÑA AND PIRENAICA HEIFERS WITH DIFFERENT GROWTH RATES IN THE REARING PERIOD

ABSTRACT: This study analysed the effects of heifer breed and growth rate during the rearing period on the onset of puberty and fertility at fixed-time artificial insemination (FTAI) at 15 months. Twelve Parda de Montaña and 13 Pirenaica heifers, born in autumn, were assigned to two growth rates during the rearing period (6-15 months: 0.7 vs 1.0 kg/d in Low and High, respectively). The age at onset of puberty was affected by breed (9.0 vs. 10.7 months in Parda de Montaña and Pirenaica, $P<0.05$). No differences were found in the age at conception (16.4 months) or fertility rate (92%) for any of the main effects. These preliminary results would confirm the feasibility of advancing the first service to 15 months of age in both breeds, provided adult size and calving ease are not impaired at first and subsequent calvings.

Keywords: breed, FTAI, replacement, reproductive performance.

INTERVALO ENTRE PARTOS, CONDICIÓN CORPORAL AL PARTO Y DURACIÓN DE LA LACTACIÓN DE VACAS EXPLOTADAS BAJO PARIDERA CONTINUA EN EL ECOSISTEMA DE LA DEHESA: FACTORES DE VARIACIÓN

Daza, A

Departamento de Producción Agraria (Unidad de Producción Animal)
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas
Universidad Politécnica de Madrid. argimiro.daza@upm.es

INTRODUCCIÓN

En las explotaciones de vacas de cría en el ecosistema de la Dehesa la fertilidad es la variable económica más relevante. Se asume que cuando el manejo de la reproducción observa parideras continuas el intervalo entre partos (IEP) evalúa adecuadamente la fertilidad. El IEP es una variable en la que influye un conjunto muy amplio de factores: tipo genético, edad de la vaca, condición corporal a parto (CCP), época de parto, alimentación, sexo y tipo genético del ternero, edad al destete, ganadería, año, estado sanitario, etc (Daza, 2014). En el marco de la gestión técnico-económica de las ganaderías de vacas de cría productoras de terneros al destete reviste especial interés para los ganaderos conocer el efecto y el alcance de los precitados factores con el fin optimizar la productividad y el rendimiento económico de las explotaciones. En el presente trabajo descriptivo se estudia la influencia de algunas de las precitadas variables sobre el IEP y, adicionalmente, se consideran los factores de variación que influyen en la condición corporal de las vacas al parto y en la duración de la lactación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han controlado 645 partos, 619 destetes y 547 intervalos entre partos que transcurrieron durante 12 años ganaderos consecutivos (uno de octubre de 2000 hasta 30 de septiembre de 2012), de 97 vacas (8 Retintas y 91 cruzadas Charolés x Retinta), servidas por toros Limusín y Charolés, en una explotación de vacas de cría situada en el término municipal de Casar de Cáceres (Cáceres). El rebaño se desenvuelve en tres cercados próximos bajo paridera continua y una carga ganadera aproximada, en cada uno de ellos, de 0,38 vacas tipo/ha. La edad al destete de los terneros fluctuó entre 5 y 8 meses según el mes de nacimiento. El rebaño se suplementó con concentrado, administrado en el suelo en forma de tacos, según disponibilidades coyunturales de pasto y estado fisiológico de las vacas, desde primeros de julio hasta finales de febrero. La CCP se determinó mediante una escala subjetiva desde 1 a 3 puntos inspirada en la de Agabriel et al. (1996) utilizada para la raza Charolesa. Se controló así mismo la suplementación de las vacas según mes de parto durante los últimos tres años experimentales. Los datos recabados se han estudiado mediante análisis de varianza, covarianza y regresión simple utilizando el paquete estadístico SPSS-16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor medio del IEP fue de 392,6 días (sem = 8,91), inferior al observado por Daza y González (1997), en vacas del mismo tipo genético (404 días) bajo paridera continua, y por López de Torre et al (1989) en vacas Retintas (428 días) y Charolés x Retinta (413 días) sometidas a paridera concentrada de otoño–invierno en la Dehesa extremeña.

En el IEP no tuvieron influencia significativa el tipo genético de la vaca (Retinta vs Charolés x Retinta), el cercado, el mes del parto, el sexo y el tipo genético del ternero amamantado [(Charolés x Retinta), Charolés x (Charolés x Retinta) y Limusín x (Charolés x Retinta)], el año y la CCP. La edad de los terneros al destete, introducida en el modelo estadístico como covariable tampoco tuvo influencia significativa sobre el IEP. Sin embargo, como cabía esperar, el efecto vaca y el orden de parto afectaron significativamente ($P < 0,05$) al IEP. Las vacas primíparas y las viejas de más de 10 partos tuvieron IEP significativamente más largos que las vacas de segundo a sexto parto (Tabla 1) resultados acordes con los obtenidos en vacas de los mismos tipos genéticos por Daza y González (1997). La mayor duración del IEP en novillas se explica por una mayor frecuencia de partos difíciles y por sus mayores exigencias nutritivas en el primer ciclo reproductivo (Osoro, 1986), mientras que en las vacas viejas la pérdida de habilidad en el pastoreo conduce a una reducción de la

condición corporal al parto y, como consecuencia, a un aumento del IEP. En la Tabla 1 también puede observarse como la CCP se reduce significativamente en vacas de nueve y más partos, resultado que puede explicar el aumento significativo del IEP de las vacas viejas. El tipo genético de la vaca, el cercado, el mes del parto y el tipo genético del ternero también tuvieron influencia significativa sobre la CCP. Las vacas cruzadas Charolés x Retinta tuvieron mayor CCP que las Retintas (2,03 vs 1,19). Las vacas del cercado más pequeño tuvieron mayor CCP que las de los cercados más grandes y las reproductoras que gestaron terneros Charolés x (Charolés x Retinta) o Limusín x (Charolés x Retinta) tuvieron una CCP menor que las que gestaron terneros Charolés x Retinta 1,52, 1,73 y 2,12 respectivamente). La CCP, según mes de parto, estuvo muy relacionada con las disponibilidades de pasto en los tres últimos meses de gestación y la relación entre la CCP y mes del parto (MP) respondió a una función cuadrática de estructura: $CCP = 0,41 + 0,57 MP - 0,042 MP^2$ ($R^2 = 0,47$, $n = 645$, $P < 0,0001$)

Tabla 1. Efecto del orden de parto (OP) sobre el IEP y la CCP de vacas Retintas y Charolés x Retinta en el ecosistema de la Dehesa.

OP	n	IEP (días)	n	CCP (1)
1	99	428,3 ^a	99	1,67 ^a
2	88	392,8 ^c	98	1,74 ^a
3	73	369,3 ^d	88	1,80 ^a
4	61	365,8 ^d	73	1,67 ^a
5	47	361,1 ^d	61	1,78 ^a
6	41	360,3 ^d	47	1,69 ^a
7	34	397,8 ^{bc}	41	1,77 ^a
8	28	416,5 ^{abc}	34	1,68 ^a
9	21	388,5 ^{cd}	28	1,38 ^b
≥ 10	55	425,6 ^{ab}	76	0,92 ^c
sem	-	8,9	-	0,07
P <	-	0,0001	-	0,0001

n = n° de observaciones. (1) escala de 1 a 3 puntos de menor a mayor CCP.sem = error estándar de la media. Medias con distintos superíndices difieren $P < 0,05$.

Tabla 2 Efecto del mes del parto en la edad al destete (ED) y en la suplementación media de los últimos tres años de las vacas con concentrado.

Mes	n	ED (días)	Meses de suplementación	kg de concentr/vaca y año
enero	81	167,5 ^h	octubre-febrero	417,3 ^{fg}
febrero	74	187,3 ^g	julio y octubre-febrero	489,7 ^{de}
marzo	51	202,9 ^{de}	julio-febrero	705,0 ^b
abril	41	223,4 ^{ab}	julio-febrero	731,1 ^{ab}
mayo	62	230 ^a	julio-febrero	766,2 ^a
junio	48	218,3 ^{bc}	julio-febrero	764,0 ^a
julio	54	233 ^a	julio-febrero	772,3 ^a
agosto	21	217,9 ^{bcd}	julio-febrero	737,0 ^{ab}
septiem	38	213,6 ^{cd}	julio-febrero	761,3 ^{ab}
octubre	30	206,6 ^d	agosto-febrero	568,7 ^c
noviem	31	191,8 ^g	septiembre -febrero	471,7 ^{ef}
diciem	88	193,4 ^{eg}	octubre-febrero	372,0 ^g
sem	-	4,15	-	19,3
P <	-	0,0001	-	0,0001

n = n° de observaciones. sem = error estándar de la media. Medias con distintos superíndices difieren $P < 0,05$.

De otra parte, la paridera continua en la Dehesa genera que el tiempo de amamantamiento de los terneros sea significativamente variable según mes del parto (Tabla 2) si se pretende lograr que el peso de los terneros al destete esté comprendido entre 200 y 300 kg, tal como exigen los cebaderos compradores. Así, de la Tabla 2 puede colegirse cómo los terneros

nacidos desde abril hasta agosto necesitaron más tiempo de amamantamiento que los nacidos desde diciembre a febrero para alcanzar pesos comercialmente adecuados al destete. También puede observarse, en la precitada tabla, como la suplementación alimenticia es especialmente importante en las vacas que paren desde marzo a septiembre, suponiendo alrededor del 30% de las necesidades energéticas anuales de la vaca tipo (INRA, 2007).

Los resultados obtenidos sugieren, de una parte, una reflexión sobre el abandono de la paridera continua debido a su mayor coste de producción, y de otra la reducción de la edad de eliminación de las vacas, ya que las excesivamente viejas, claramente, pierden habilidad de pastoreo disminuyendo, como consecuencia, su CCP y aumentando el IEP.

Agradecimientos: Mi consideración a Félix Sánchez Tovar y a José Sánchez Cordero, sin cuya valiosa colaboración no hubiera sido posible este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agabriel, J., Giraud, J.M., Petit, M. 1996. Détermination et utilisation de la note de l'état d'engraissement en élevage allaitant. Bull Tch. CRZV, Thies INRA 66: 43-50.
- Daza, A., González, M. 1997. Variación del intervalo entre partos de vacas Retintas y Charolésx Retinta sometidas a paridera continua. Archivos de Zootecnia, 46: 347-355
- Daza, A. 2014. Vacuno de carne con criterios económicos. Ed Agrícola Española S.A, 320 pp.
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Editions Quae. INRA.
- López de Torre, G., García, L.J., Jiménez, J.M 1989. Influencia del número de gestación y época de parto sobre el intervalo entre partos en vacuno Retinto. Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales. 4: 45-51.
- Osoro, K. 1986. Efecto de las principales variables de manejo sobre los parámetros reproductivos en vacas de cría. Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales, 1: 89-111.

CALVING INTERVALS, BODY CONDITION AT CALVING AND LACTATION LENGTH OF COWS REARED UNDER CONTINUOUS CALVING IN DEHESA ECOSYSTEM: VARIATION FACTORS

Five-hundred and forty seven calving intervals (CI), 645 calvings and 619 weanings from 8 Retinta cows and 89 crossbreed (Charolais x Retinta) cows in a farm in dehesa ecosystem with continuous calving were controlled. The cows were located in three fences The stocking rate in all fences of the farm was 0,38 cows/ha. The average CI was 392.6 days. Cow breed, the fence, month of calving, gender and breed of calf, year of calving, body condition score at calving and lactation duration had not significant effect on CI. However, cow and calving order affected significantly ($P < 0.05$) at CI. The CI according to the parity number were: 428.3, 392.8, 369.3, 365.8, 361.1, 360.3, 397.8, 416.5, 388.5 and 425.6 days from the 1st to the 10th and following respectively. Cow breed, the fence, month of calving and breed of calf had significant influence ($P < 0.05$) on body condition at calving. The month of calving affected significantly ($P < 0.05$) at the weaning age of calves It is concluded that continuous calving in dehesa ecosystem is not interesting for producers. A reduction of culling age of cows can be advisable to decrease the CI.

Keywords: Dehesa cows, calving intervals, body condition, weaning age

EFFECTO DE DIVERSOS FACTORES DE EXPLOTACIÓN SOBRE EL INTERVALO ENTRE PARTOS DE VACAS DE RAZA BERRENDA EN NEGRO

Álvarez, S., Palacios, C. y Sánchez-Ocaña, A.

Área de Producción Animal. Universidad de Salamanca.
Filiberto Villalobos 119, 37007 Salamanca. salvarez@usal.es

INTRODUCCIÓN

La raza bovina Berrenda en negro es una raza de producción extensiva, calificada como en peligro de extinción por el MAGRAMA con pocas referencias sobre sus características reproductivas comparadas (Porrás y Ojeda, 2000). Aunque tiene una distribución nacional, el número de efectivos en el Libro Genealógico es de 1903 hembras reproductoras en 95 ganaderías en toda España (MAGRAMA 2015). Como en todas las razas de carne, la fertilidad es un factor fundamental en la rentabilidad de esta producción. Hay diversos factores que influyen en la fertilidad de las vacas de aptitud cárnica en régimen extensivo (Osoro, 1986; Daza y González, 1997). En este trabajo, se analiza la fertilidad medida de las vacas a través del intervalo entre partos, analizando la influencia que sobre este parámetro pueden tener la edad de la vaca, el año y la estación en el momento del parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 173 intervalos entre partos de 90 vacas, pertenecientes a una ganadería situada en la provincia de Cáceres, a lo largo de 4 años. La paridera se distribuye a lo largo de todo el año. Los animales se alimentan del pasto natural (con una carga ganadera de 0,6 UGM/ha), y reciben alimentación suplementaria en épocas de escasez, especialmente en verano e invierno, basada en heno de alfalfa o bien otros alimentos forrajeros (en torno a 6-8 kg/vaca/día) y pienso comercial (2 kg/vaca/día, salvo en los dos primeros meses de la lactación que se les administran 3 kg/vaca/día). La primera cubrición es tardía, con una edad 23 meses, de manera que el primer parto se da en torno a los 32 meses. Se han recogido los datos de partos sobre el libro de explotación de la ganadería participante, registrando el número y edad de la madre, fecha de parto, número y sexo del ternero.

Se han analizado los intervalos entre partos mediante análisis de varianza con el procedimiento GLM del programa estadístico Statgraphics Plus 2.1, dentro de un modelo que incluye como efectos fijos, el año (2010-2011 con n=41 partos, 2011-2012 con n=40 partos, 2012-2013 con n=46 partos y 2013-2014 con n=46 partos), la edad de la vaca (considerando tres grupos: de 3 a 4 años con N=56 partos, de 5 a 10 años con N=98 partos y más de 10 con n=16 partos), y la influencia de la estación del año, agrupando los datos en cuatro grupos, (invierno con n=50 partos, primavera con n=50 partos, verano con N=16 partos y otoño con n=56 partos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El intervalo medio (\pm S.E.) obtenido es de 425,14 (\pm 12,63) días. Respecto a otras razas que se explotan en condiciones similares, es superior al obtenido para moruchas (390) o Moruchas cruzadas con Charoles (397) (Álvarez y Palacios, 2013), al recogido por Daza y González (1997) para Retinta (414 días) y también al que obtienen Porrás y Ojeda (2000) para Berrendo en Colorado (414 días). Lo mismo ocurre si la comparamos con los datos obtenidos con la raza Asturiana de los Valles (378 días) y de la Asturiana de Montaña (389 días) (Román, 2014).

Hemos encontrado valores superiores, en cambio, en las vacas de doble aptitud del Estado de Veracruz, en México (474 días) (Arellano et al., 2006) e inferiores a las referencias de las criollas colombianas (Alfonso et al., 2007). Muy próximos quedan los intervalos entre partos de las vacas de doble propósito del Estado de Yucatán en México (427 días) (Hernández-Reyes et al., 2001).

Como se detalla en la Tabla 1, no se han encontrado diferencias significativas entre el intervalo entre partos de las vacas en función de la edad, como estadísticamente obtuvimos en las vacas de raza Morucha (Álvarez y Palacios, 2013), así como los de Daza y González (1997) en Retinta y Legide (1996) en Rubia gallega. En este caso, no hay diferencias entre

las vacas con más de 10 años y el resto, aunque se observan mayores valores medios. Esto podría deberse a un control productivo, que hace que permanezcan en la explotación solamente las vacas que se mantengan en niveles productivos aceptables.

Se han encontrado diferencias significativas en función del año de parto. En la campaña 2012-2013, los resultados son significativamente inferiores (400,83 días) que los de 2013-2014 (449,94 días) (Tabla 1); son resultados coherentes con otros trabajos (Caballero y Buxadé, 1995; Ormazábal y Osoro, 1995; Daza y González, 1997), y que pueden reflejar el carácter extensivo de la producción, dependiente en gran medida de las condiciones meteorológicas.

Encontramos diferencias significativas en el intervalo entre partos (Tabla 1) en función de la estación climatológica del año; los partos ocurridos en otoño obtuvieron mayor intervalo (466,39 días) que los ocurridos en invierno (422,9 días) y los ocurridos en verano (382,69 días) que son los que han obtenido menor intervalo de todos. Daza y González (1997) en Retinta no encontraron diferencias significativas en función de la estación. Esto podría deberse a que a pesar del aporte de alimentación suplementaria, las cubriciones en invierno y verano (que corresponden a los partos de otoño y primavera) se realizan en condiciones nutritivas menos favorables y se alarga el intervalo entre partos.

Así pues, al analizar el intervalo entre partos no se ha encontrado un efecto de la edad en vacas. Aparecieron diferencias entre los años estudiados y en función de la estación de parto, que pueden deberse a la diferencia de recursos pastables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso, G., Suarez, M.A., Perez, J.E. 2007. Corpoica *cienc. tecnol. agropecu.* 8 (2): 74-80.
- Alvarez, S., Palacios, C. 2013. AIDA XV Jornadas sobre Producción Animal (II): 326-329.
- Arellano, S., Martínez, J., Romero, E., Briones, F., Dominguez, M., de la Gaza, F. 2006. *Av. de Inv. Agropecuarias* 10(1): 43-53.
- Caballero, J.R., Buxadé, C. 1995. *ITEA vol. extra 16 (I)*: 401-403.
- Daza, A., González, M. 1997. *Arch. Zootec.* 46: 347-355.
- Legide, M., 1996. *Arch. Zootec.* 44: 75-78.
- Osoro, K. 1986. *Investig. agrar. Prod. Sanid. anim.*, 1(1-2): 89-111.
- Hernández-Reyes, E., Segura-Correa, V.M., Segura-Correa, J.C., Osorio-Arce, M.M. 2001. *Agrociencia*, 35: 699-705.
- MAGRAMA. 2015 Raza bovina Berrenda en Negro. Catálogo de Razas. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/bovino/berrenda-negro/default.aspx>.
- Porras, C.J., Ojeda, J. 2000. *Arch. Zootec.* 49: 59-62.
- Román, A. 2014. Efecto del manejo sobre parámetros reproductivos en vacas de raza Asturiana de los Valles y Asturiana de la Montaña. Informe. Universidad de Oviedo.

Tabla 1. Efecto de los factores estudiados sobre el intervalo entre partos de vacas de raza Berrenda en Negro

	n	Media \pm error estándar	Nivel de significación
Media general	173	425,14 \pm 12,63	
<u>Año</u>			
2010-2011	41	420,77 \pm 19,58 ^{ab}	P<0,01
2011-2012	40	400,83 \pm 29,04 ^a	
2012-2013	46	429,02 \pm 21,78 ^{ab}	
2013-2014	46	449,94 \pm 21,71 ^b	
<u>Edad</u>			
3 y 4 años	59	428,51 \pm 15,39	NS
De 5 a 10 años	98	407,90 \pm 10,76	
11 años o más	16	439,01 \pm 30,31	
<u>Estación de parto</u>			
Invierno	50	422,90 \pm 15,24 ^a	P<0,01
Primavera	50	428,58 \pm 33,87 ^{ab}	
Verano	16	382,69 \pm 35,40 ^a	
Otoño	57	466,39 \pm 14,25 ^b	

^{a, b}: Superíndices diferentes dentro de cada factor indican diferencias significativas al nivel indicado en la última columna. NS: No significativo.

EFFECT OF SEVERAL FACTORS ON CALVING INTERVAL ON BERRENDA EN NEGRO COWS

ABSTRACT: 173 calving intervals of 90 cows belonging to endangered breed Berrenda en Negro have been analyzed, in order to know effect of age, year and calving season on fertility. Mean interval is 425.14 (\pm 12.63) days, longer than other Spanish breeds kept in similar extensive systems, and similar or shorter than intervals found in some Latin American systems. No effect of age (cows<4 year-old; 5-10 year-old; >10 year-old) has been found, but some years have had longer calving interval, and cows calving in autumn showed the longest interval. Both kind of differences may be due to less feed available in some years in an extensive production system, and in some seasons, in spite of supplementary feeding.

Keywords: Berrenda en Negro, calving interval, fertility, extensive cattle.

ESTADO REPRODUCTIVO ACTUAL DEL SECTOR BOVINO LECHERO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

Jiménez-Calderón, J.D., Martínez-Fernández, A. y Vicente, F.
Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). 33300 Villaviciosa (Asturias). fvicente@serida.org

INTRODUCCIÓN

El sector productor de vacuno de leche ha experimentado un proceso de intensificación en las últimas décadas (Álvarez et al., 2008), con un incremento en la presión de selección, entre otros factores. Este hecho ha provocado que en muchas zonas productoras (el Principado de Asturias entre ellas) coexista una amplia variedad de explotaciones, desde pequeñas granjas familiares a grandes explotaciones tecnificadas, cada una de ellas con diferentes niveles de intensificación. Una consecuencia de este proceso ha sido la aparición, cada vez con mayor frecuencia, de problemas reproductivos. Datos previos (2002-2013) facilitados por ASCOL (Asturiana de Control Lechero) muestran la evolución de algunos de los índices reproductivos, apreciándose un empeoramiento progresivo a medida que pasan los años y avanza la intensificación, con un promedio durante esos años de 2,36 inseminaciones/gestación y 433 días de intervalo entre partos, situándose este último por encima del nivel óptimo recomendado (400 días).

En base a estas premisas, el objetivo de este trabajo fue evaluar la situación reproductiva de las ganaderías de vacuno lechero en el Principado de Asturias, en función del tamaño de los rebaños, considerando que éste se relaciona directamente con un mayor nivel de intensificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estableció una muestra estratificada y elegida al azar de las explotaciones de vacuno lechero del Principado de Asturias, compuesta por aproximadamente el 2%, de explotaciones con cuota láctea asignada en el año 2012 (2446 ganaderías en total según los datos oficiales facilitados). De esta forma, la muestra final quedó compuesta por un total de 52 ganaderías. Las explotaciones seleccionadas se estratificaron en 4 grupos en función de la cuota asignada, quedando distribuidas de la siguiente forma: 11 explotaciones con menos de 175 t de leche (estrato 1); 17 con cuota comprendidas entre 175 y 325 t (estrato 2); 10 ganaderías entre 325 y 500 t (estrato 3) y 14 con cuota superiores a 500 t (estrato 4). Para la obtención de los datos necesarios para el estudio se diseñó una encuesta estructurada en 7 bloques, siendo el último de ellos el que englobaba las cuestiones relativas a los índices y parámetros reproductivos referentes al año 2013. Las encuestas se hicieron mediante entrevista personal, entre el 3 de diciembre de 2013 y el 11 de marzo de 2014, visitando cada una de las explotaciones y cumplimentando los datos con los ganaderos.

Se calcularon los valores medios para cada índice considerado (intervalo entre partos; número de inseminaciones necesarias por gestación; uso de tratamientos hormonales, de semen sexado y de transferencia de embriones) dentro de cada estrato. El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza con el procedimiento GLM del SAS (1999), considerando el estrato de producción como factor principal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tamaño medio de rebaño dentro de cada estrato fue superior conforme se incrementaba el volumen de cuota láctea. Las granjas del estrato 1 tenían una media de 18 vacas, las del estrato 2 contaban con 34 vacas de promedio, 54 vacas en el caso del estrato 3 y 99 vacas para el estrato 4. El estrato 1 presentó el nivel más bajo de producción lechera en una lactación media, con 5930 l por vaca, resultando significativamente inferior ($P < 0,05$) al resto de los estratos, siendo de 7292 l por vaca en el estrato 2, 7749 l por vaca en el estrato 3, y alcanzando el máximo en el estrato 4, con 9241 l por vaca, que resultó ser a su vez significativamente superior que los estratos intermedios ($P < 0,05$). Esto confirma que los estratos de mayor tamaño son los que están más intensificados y con mayor presión de selección. Este mayor nivel de exigencia productiva se tradujo en una disminución del número de lactaciones que una vaca permanece en el rebaño, como también describen Dillon et al. (2006) y, por consiguiente, en una mayor tasa de reposición. Así, las vacas del

estrato 1 tenían una vida útil promedio de 5,36 lactaciones. Este valor fue descendiendo en cada estrato hasta alcanzar un valor mínimo de 2,98 lactaciones en el estrato 4, con una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre ambos valores.

El intervalo entre partos (IP) resultante en cada estrato mostró que el peor valor para este índice reproductivo corresponde al mayor nivel de intensificación (Figura 1). Diversos estudios han mostrado que el incremento continuo en los niveles productivos se relaciona con una prolongación del IP (Hare et al., 2006). Así, los tres primeros estratos no tuvieron diferencias significativas entre ellos, con un promedio de 387 días de IP, diferenciándose significativamente ($P < 0,05$) del estrato 4, que tenía 416 días de IP, resultando superior al máximo de 400 días que se considera como óptimo. El número de inseminaciones artificiales (IA) necesarias para conseguir una gestación no mostró diferencias entre estratos, teniendo un promedio global de 2,68, superior a las 2,5 IA como máximo considerado como valor óptimo para este índice.

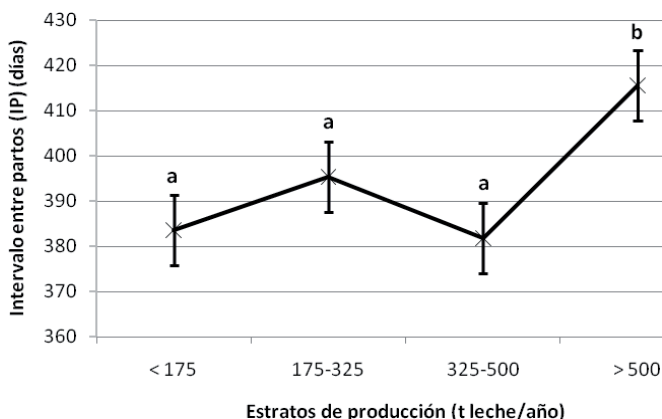


Figura 1. Días promedio de intervalo entre partos dentro de cada estrato de producción. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El incremento de la presión de selección relacionado con la intensificación se refleja también en el empleo con mayor frecuencia de técnicas y tecnologías reproductivas para contribuir a mejorar los índices reproductivos que se ven afectados y alcanzar las exigencias del ritmo de producción. De este modo, el uso de tratamientos hormonales para la inducción al celo y a la ovulación se realiza en el 96,4% de las explotaciones de los estratos 3 y 4, mientras que en los estratos 1 y 2 solamente se utiliza en el 36,4% y 58,8% de las explotaciones, respectivamente (Figura 2). De la misma forma, el empleo de semen sexado para garantizar el nacimiento de terneras, se hace más habitual a medida que las granjas son más grandes y tecnificadas. Así pues, sólo el 9,1% de las explotaciones del estrato 1 hacen uso de él. Este porcentaje se incrementa en el estrato 2 hasta el 41,2% y alcanza su nivel de uso más alto en los estratos 3 y 4, con el 80% y el 85,7%, respectivamente. La tecnología más novedosa que se ha ido incorporando es la transferencia de embriones (TE). El empleo de esta técnica en las explotaciones del estrato 1 resultó ser nulo, mientras que en el estrato 2, un 5,9% de los ganaderos afirmó haber usado TE en su explotación y los niveles se incrementaron en los estratos 3 y 4, en los que el 20% y el 28,6%, respectivamente, de las ganaderías habían usado esta técnica (Figura 3).

Por lo tanto, a partir de las encuestas realizadas, se puede concluir que el proceso de intensificación de la producción lechera se ha traducido en un descenso de la vida útil de las vacas y en unos peores índices reproductivos, como un mayor IP. A fin de mejorar estos índices, se observa también un mayor uso de técnicas reproductivas en las explotaciones más intensivas.

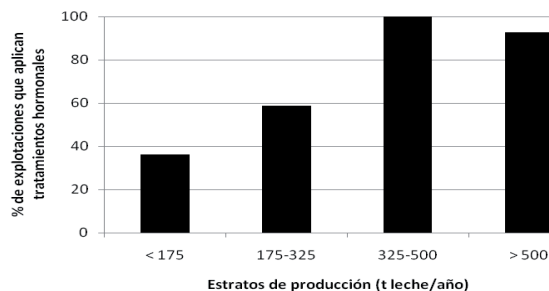


Figura 2. Porcentaje de explotaciones que aplican tratamientos hormonales en cada uno de los estratos de producción.

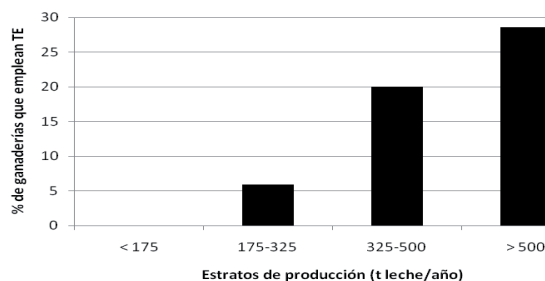


Figura 3. Porcentaje de explotaciones que realizan transferencia de embriones en cada estrato de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez et al., 2008. J. Dairy Sci. 91: 3693-3698. • Dillon et al., 2006. Livest. Sci. 99: 141-158. • Hare et al., 2006. J. Dairy Sci. 89: 365-370. • SAS, 1999. SAS/STATTM. User's guide.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2012-00065-C05-01, cofinanciado con fondos FEDER. Los autores expresan su agradecimiento a la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado de Asturias y a Asturiana de Control Lechero por los datos facilitados y al personal del SERIDA (M^a Antonia Cueto, Consuelo González y Valentín García) que colaboró en la realización de las encuestas.

CURRENT REPRODUCTIVE STATE OF DAIRY COW SECTOR IN THE PRINCIPALITY OF ASTURIAS

ABSTRACT: This work analyzed the influence of the intensification in the dairy cow sector, its reflection in the reproductive rates and the use of reproductive technologies. 52 farms were randomly selected and surveyed. The farms selected were distributed depending on their milk quotas in four groups: 11 farms lesser than 175 t/year (layer1); 17 farms between 175 and 325 t/year (layer 2); 10 farms from 325 to 500 t/year (layer 3); and 14 farms that exceed 500 t/year (layer 4). These groups were related to the intensification of production system (5930; 7292; 7749; and 9241 l per cow and per lactation, respectively; $P < 0.05$). Further intensification of milk production means worse reproductive rates and greater use of reproductive technologies. In this way, layer 4 presented the highest ($P < 0.05$) calving interval (416 days), while in the rest of farms amounted 387 days. Furthermore, hormonal treatments and embryo transfer were most frequently used on farms belonging to layers 3 and 4.

Keywords: dairy cow, intensification, reproductive rates.

EFFECTO DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) EN LA TASA DE FERTILIDAD EN VACAS DE LECHE CRUZADAS BAJO CONDICIONES DE ALTITUD EN ECUADOR

Garnica, F.P, Sagbay, C., Brito, M.C., Masache, J.L., Webster, P.G. y Minguez, C. Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Politécnica Salesiana, Calle Vieja 12-30 y Elia Luit, Cuenca, Ecuador. cminguez@ups.edu.ec

INTRODUCCIÓN

El porcentaje de fertilidad es un carácter importante en la producción de vacuno lechero. Este carácter está viéndose reducido con el paso de los años, como consecuencia de los incrementos de producción, por esta razón, se han propuesto tratamientos hormonales con el fin de incrementar la fertilidad (Friedman et al., 2014) y de la misma manera en la última década se han desarrollado bastantes protocolos de ovulación sincronizada (Martínez et al., 2014). La población de vacuno lechero en la región Andina de América del Sur se compone principalmente de animales cruzados. La característica principal de esta región es su elevada altitud y es habitual realizar inseminaciones de hembras Holstein con sementales Brown Swiss o Criollo, razas más adaptadas a condiciones de altitud (Bartl et al., 2008), para evitar la aparición de enfermedades cardíacas. Estas enfermedades asociadas a la altitud se les denomina "mal de altura" y aparecen por encima de los 1.600 m.s.n.m. generando una bajada considerable en la producción lechera (Malherbe et al, 2012). La gonadotropina coriónica equina (eCG) está siendo utilizada en protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en ganado bovino para intentar mejorar la tasa de fertilidad, ya que produce, entre otros efectos, un aumento del crecimiento folicular (Siqueira et al., 2009). Estos protocolos han obtenido buenos resultados principalmente en razas de carne (Ferreira et al., 2013). Sin embargo, en vacuno lechero los resultados son contradictorios (Bryan et al., 2009; Kenyon et al., 2012; Pulley et al., 2013). Además, la bibliografía existente sobre la utilización de eCG en bovino sometido a condiciones de altitud es escasa.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de 400 U.I de eCG en un protocolo IATF en el incremento de la tasa de fertilidad en vacas lecheras sometidas a condiciones de altitud.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio involucró a 100 vacas cruzadas (25% Brown Swiss x 75% Holstein) en periodo de lactación. Las vacas estaban alojadas en una granja comercial localizada en la Parroquia Jerusalén del Cantón Biblián, Ecuador (2° 42' 57" S, 78° 58' 7" O) a una altitud de 2640 m.s.n.m, con una temperatura media de 14,2 °C y una pluviometría media de 1180 mm por año.

Estas vacas tenían una producción media de 16,83±1,4 kg/día, en 154,2±16,6 días en lactación. Los animales estaban entre la 2° y la 7° lactación y la condición corporal (BCS) estaba entre 2.7 y 3.2 utilizando el sistema de 5 puntos: 1= delgada hasta 5 = obesa (Ferguson et al., 1994).

Aleatoriamente se distribuyeron los 100 animales en dos grupos experimentales (50 por grupo). Al grupo 1 se le aplicó 400 UI de eCG en el protocolo IATF y el grupo 2 (grupo control) siguió el mismo protocolo de IA sin la aplicación de la eCG. Ambos grupos se sometieron el mismo manejo y se ordeñaban dos veces al día (cada 12 horas aproximadamente), se alojaron en las mismas instalaciones y se alimentaron con el mismo pasto, suplementado con un pienso comercial que permitía cubrir todas sus necesidades alimentarias. Tuvieron agua fresca accesible en todo momento. No se observó ningún problema sanitario en el periodo que duró el experimento.

En el protocolo IATF se designó como día 0 (D0) al momento en que se les colocó, a todos los animales, un dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Pfizer Cambridge, USA) y una dosis intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (Fertigan®, Laquinsa, San Jose, Costa Rica). El D7, el dispositivo intravaginal se retiró y se administraron 25 mg de PGF2α (Lutalyse®, Zoetis Quito, Ecuador). El D8 a todas las vacas se les aplicó 1 mg de benzoato de estradiol (Fertigan®, Laquinsa, San Jose, Costa Rica). Treinta horas después (D9) las

vacas fueron inseminadas. Inmediatamente después de la inseminación (D14), a las vacas del grupo 1 se les aplicó una dosis de 400 UI de eCG (Folligon®, Intervet Ecuador) El D45 se realizó un test de gestación mediante observación por ultrasonidos (Aloka ProSound 2, Hitachi – Aloka Medical Ltd., Tokio, Japan). El protocolo IATF empleado para los grupos 1 y 2 puede observarse en la Figura 1.

El análisis estadístico se realizó mediante un test chi-cuadrado para comparar los porcentajes de éxito entre grupos (R Project, versión 3.1.2, University of California, Los Angeles, USA). Se asumió un valor de P menor de 0,05 como diferencia significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de fertilidad para la suma de todas las vacas en el estudio fue del 69%. Para el grupo 1 (tratadas) se obtuvo un 62% de fertilidad y un 76% para el grupo 2 (grupo control). Aunque estas diferencias para el porcentaje de fertilidad no alcanzaron significación estadística ($P=0.13$). Por tanto, la aplicación de 400 UI de eCG en el protocolo IATF en vacuno lechero sometido a condiciones de altitud no aumentó la fertilidad.

Estos resultados concuerdan con Souza et al. (2009) y Pulley et al. (2013). También están de acuerdo con Ferreira et al. (2013) que utilizó tres grupos de vacas Holstein, unas tratadas con 400 UI de eCG, otras con 600 UI y el grupo control, para los cuales no encontraron diferencias significativas en tasa de fertilidad.

Sin embargo, si se han obtenido beneficios en la aplicación de eCG en protocolos IATF para vacuno de carne. Tortodella et al. (2013) logró incrementar el diámetro folicular, el volumen luteal y la tasa de fertilidad. Sa Filho et al. (2010) en Nelore y Martinez et al. (2014) en Angus obtuvieron resultados positivos en fertilidad tras la aplicación de eCG en protocolos IATF similares al empleado en nuestro estudio. Las diferencias observadas entre los estudios realizados con vacuno lechero con respecto a vacuno de carne pudieran ser explicadas por la menor BCS y la mayor incidencia del anestro en vacuno de carne con respecto al vacuno lechero ya que estos parámetros son importantes en la eficiencia de la eCG (Ferreira et al., 2013).

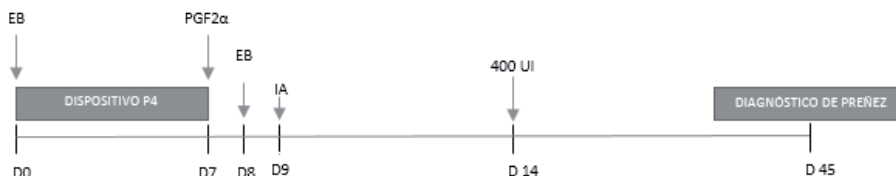
En conclusión, la incorporación de 400 UI de eCG en los protocolos IATF en vacuno lechero cruzado bajo condiciones de altitud y con una buena BCS no afecta al porcentaje de fertilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bartl, K., Gómez, C.A., García, M., Aufdermauer, T., Kreuzer, M., Hess, H.D., Wettstein, H.R., 2008. Archives of Animal Nutrition. 62:468-484.
- Bryan, M. A., Bó, G. Heuer, A C., Emslie, F. R., 2009. Reprod. Fertil. Dev. 22:126–131.
- Ferguson, J.D., Galligan, D.T., Thomsen, N., 1994. J. Dairy Sci. 77, 2695–2703.
- Ferreira, R.M., Ayres, H., Sales, J.N.S., Souza, A.H., Rodrigues, C.A., Baruselli, P.S., 2013. Animal Reproduction Sci. 140:26:33.
- Friedman, E., Voet, H., Reznikov, D., Wolfenson, D., Roth, Z., 2014. J. Dairy Sci. In press.
- Kenyon, A. G., Lopes, G., Mendonça, L. G. D., Lima, J. R., Bruno, R. G. S., Denicol, A. C., Chebel R. C., 2012. Theriogenology 77:400–411.
- Malherbe, C.R., Marquard, J.D., Legg, E., Cammack, K., O'Tool, D., 2012. Veterinary Sci. 24:867-877.
- Martinez, M.F., Tutt, D., Quirke, L.D., Tattersfield, G., Juengel, J.L. 2014. J. Anim. Sci. 92: 4935-4948.
- Pulley, S.L., Wallace, L.D., Mellieon, H.I., Stevenson, J.S., 2013. Theriogenology, 79:127–134.
- Sa Filho, M.F., Torres-Junior, J.R., Penteadó, L., Gimenes, L.U., Ferreira, R.M., Ayres, H., Castro, E.P.L.A., Sales, J.N., Baruselli, P.S., 2010. Anim. Reprod. Sci. 118:182–187.
- Siqueira, L.C., Oliveira, J.F., Rovani, M.T., Ferreira, R., Borges, L.F., Gonçalves, P.B. 2009. Theriogenology, 71:614–619
- Souza, A.H., Viechnieski, S., Lima, F.A., Silva, F.F., Araujo, R., Bo, G.A., Wiltbank, M.C., Baruselli, P.S., 2009. Theriogenology. 72:10–21
- Tortorella, R., Ferreira, R., Tonello Dos Santos, J., Silveira de Andrade Neto, O., Barreta, M.H., Oliveira, J.F., Gonçalves, P.B., Pereira Neves, J., 2013. Theriogenology, 79:1204-1209.

Agradecimientos: Los autores expresan su agradecimiento a Juan Pablo Sánchez Serrano (IRTA, Cataluña) por sus consejos y comentarios. Al personal trabajador de la hacienda “El Cortijo”, en especial al Dr. Daniel Guamán Guamán por las facilidades ofrecidas para realizar nuestro trabajo y al propietario de la hacienda, el Ing. José Vélez por darnos la posibilidad de utilizar sus animales e instalaciones para llevar a cabo esta investigación.

Grupo 1



Grupo 2



Figura 1. Diseño experimental para evaluar el efecto de la administración de 400 UI de eCG el día 14 en un protocolo de inseminación artificial (IATF) en la tasa de fertilidad en vacas cruzadas en lactación sometidas a condiciones de altitud. P4= Progesterona; IA= Inseminación artificial; EB=Benzoato de estradiol; eCG=gonadotropina coriónica equina.

EFFECT OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) IN THE FERTILITY RATE OF CROSSBRED DAIRY COWS UNDER HIGH ALTITUDE CONDITIONS IN ECUADOR

ABSTRACT: An experiment was carried out to estimate the effect of eCG in fertility rate of crossbred dairy cows (25% Brown Swiss x 75% Holstein) subjected to high altitude conditions in Ecuador. These conditions could produce a syndrome of right-sided heart failure produced by elevated blood pressure in the pulmonary arterial tree and, as consequence, it produces a decrease in productivity and fertility. In the experiment, the data were derived from 100 lactating cows, randomly divided into two groups (50 cows per group). The cows were subjected to a protocol of synchronization for ovulation timed artificial insemination (IATF). One group of them was treated with 400 UI of eCG in the IATF protocol and the other was the control group. The IATF was: Day0 (D0)-a progesterone releasing intravaginal device and 2mg of estradiol benzoate, D7-progesterone releasing intravaginal device removed and 25mg PGF2α, D8-2mg of estradiol benzoate, D9AM-IATF, D14-400mg eCG (only for group 1), D45-Pregnancy diagnosis by ultrasonography examination. A Chi-square test reported non-significant differences between the two groups (P -value = 0.13). Thus, adding 400 UI of eCG into the IATF protocol was inefficient to improve the fertility rate in crossbred cows subjected to high altitude in crossbred dairy cattle in Ecuador.

Keywords: eCG, high altitude, dairy cows, fertility rate

ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON PROGESTERONA A DIA 16-19 POST-INSEMINACION SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ESTIMULADOS POR INTERFERÓN TAU (IFN- τ) EN VACAS LECHERAS.

López-Helguera¹, I., Tuono, T., Mur, R., López-Gatius, F. y Serrano-Pérez, B.

¹Agrotecnio, Universidad de Lleida, Lleida, España. irenelh@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La fertilidad en la vaca es un factor clave en la rentabilidad de la explotación. En los últimos años los problemas reproductivos del vacuno de leche se han intensificado, disminuyendo la fertilidad y eficacia reproductiva de estos animales (López-Gatius, 2003). El origen del problema es multifactorial, siendo el elevado metabolismo de la vaca lechera de alta producción un punto determinante en la reducción de los niveles de progesterona y estradiol en sangre (Wolfenson et al., 2004). La progesterona ejerce un papel muy importante durante el reconocimiento materno de la preñez (Spencer et al., 2007). Por ello, concentraciones de progesterona inadecuadas durante el desarrollo temprano del embrión podrían estar relacionadas con la reducción de la fertilidad observada (Wiltbank et al., 2011). La progesterona es indispensable para la preparación del endometrio y el mantenimiento de la gestación, por lo que un aporte exógeno de esta hormona post-inseminación (IA) podría incrementar la fertilidad de las vacas lecheras en lactación. Además, la progesterona está directamente relacionada con el crecimiento del conceptus y éste con los niveles de interferón tau (INF- τ) (O'Hara et al., 2014). La producción de interferón tau (INF- τ) por el embrión, no sólo bloquea la luteólisis, sino que induce la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) tanto a nivel local como en la circulación periférica (Gifford et al., 2007). Algunos de estos ISGs, como el ISG15, o las proteínas Mx1 y Mx2 (*myxovirus resistance 1 y 2*) poseen un importante papel en la respuesta antiviral y en la inmunomodulación materna durante la implantación (Hansen y Pru, 2014).

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de la suplementación con progesterona mediante un dispositivo intravaginal (PRID) entre los días 16-19 post-IA sobre la expresión de los genes ISG15, Mx1 y Mx2 en vacas lecheras de alta producción.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una granja comercial con 650 vacas en lactación situada en la franja de Lleida-Huesca. La población de estudio estuvo constituida por 14 vacas múltiparas de raza Frisona inseminadas mediante IA a celo visto con dosis seminales de toros Frisones de fertilidad probada. El día 16 post-IA, los animales se asignaron aleatoriamente a un grupo control (n=5) o tratamiento (n=9) a los que se les introdujo un PRID (1,55 g de progesterona; CEVA, Francia) durante 3 días, retirando el dispositivo el día 19 post-IA. El diagnóstico de gestación se realizó los días 28-34 post-IA mediante ecografía transrectal. De cada animal, se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea en 2 tubos con EDTA (5 ml) (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, GB) el día 20 post-IA. A partir de esta muestra se aislaron las poblaciones mononucleares mediante un gradiente de densidad con Histopaque-1077 (SIGMA-ALDRICH, Madrid, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN de las células mononucleares se extrajo mediante el protocolo Trizol (Invitrogen), se trató con DNAsas y se obtuvo ADN copia (cDNA) mediante transcripción reversa en presencia de iniciadores random con la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Alcobendas-Madrid, España). La expresión de ARN mensajero para los genes ISG15, Mx1, Mx2 y el gen de referencia β -actina se determinó mediante PCR a tiempo real empleando el sistema SYBR Green (Thermo Scientific, Alcobendas-Madrid, España) en un aparato de detección ABI PRISM™ 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). Los resultados se expresaron en expresión relativa (RQ). De cada animal se tomaron datos de la fertilidad, y de la expresión génica de ISG15, Mx1, Mx2 y β -actina el día 20 post-IA. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test U de Mann-Whitney con el paquete SPSS v.17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fertilidad de la población de estudio fue del 50% (7/14). De los animales gestantes, tres pertenecían al grupo control (3/5) y cuatro al grupo tratado con PRID (4/9). La fertilidad estuvo significativamente relacionada con la expresión génica del ISG15 ($P=0,013$), Mx1 ($P=0,035$), y Mx2 ($P=0,018$), presentando los animales gestantes niveles de expresión superiores a los no gestantes (Figura 1). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Hansen y Pru (2014) en hembras preñadas. Sin embargo, la suplementación con progesterona entre los días 16 y 19 post-IA no afectó a la expresión génica de los ISGs, observándose niveles similares de ISGs entre el grupo control y el grupo tratado con PRID (Figura 2). En un estudio previo, la suplementación con progesterona a través de un PRID entre los días 4 y 11 post-IA no mejoró la fertilidad en vacas lecheras inseminadas a tiempo fijo (Colazo et al., 2013). De la misma manera, el tratamiento con progesterona entre los días 4 y 18 post-IA no mejoró la fertilidad ni incrementó la expresión de ISGs a día 19 post-IA a celo visto (Monteiro et al., 2014). Por el contrario, otros trabajos encontraron mejoras en la fertilidad tras el tratamiento con progesterona post-IA (Friedman et al., 2012). A la vista de los resultados preliminares obtenidos no observamos un efecto del tratamiento con progesterona a día 16 post-IA sobre la expresión de genes ISGs en vacas múltiparas, siendo necesarios posteriores estudios que clarifiquen esta interacción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Colazo, M.G., Dourey, A., Rajamahendran, R., Ambrose, D.J. 2013. *Theriogenology* 79: 833-41. • Friedman, E., Roth, Z., Voet, H., Lavon, Y., Wolfenson, D. 2012. *J Dairy Sci* 95: 3092-9. • Gifford, C.A., Racicot, K., Clark, D.S., Austin, K.J., Hansen, T.R., Lucy, M.C., Davies, C.J., Ott, T.L. 2007. *J. Dairy. Sci.* 90: 274-80. • Hansen TR, Pru JK. 2014. *Adv. Exp. Med. Biol.* 759: 13-31. • López-Gatius F. 2003. *Theriogenology* 60: 89–99. • Monteiro Jr., P. L. J., Ribeiro, E. S., Maciel, R. P., Dias, A. L. G., Solé Jr., E., Lima, F. S., Bisinotto, R. S., Thatcher, W. W., Sartori, R., and Santos, J.E.P. 2014. *J. Dairy Sci.* 97: 1-15. • O'Hara, L., Forde, N., Carter, F., Rizos, D., Maillou, V., Ealy, A.D., Kelly, A.K., Rodriguez, P., Isaka, N., Evans, A.C., Lonergan, P. 2014. *Reprod Fertil Dev* 26(2):328-36. • Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer, R. C. Burghardt, and M.Palmarini. 2007. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 65–78. • Wiltbank, M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, R. W. Bender, and A. B. Nascimento. 2011. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 238–243. • Wolfenson D., Inbar G., Roth Z., Kaim M., Bloch A., Braw-Tal R. 2004. *Theriogenology* 62: 1042–1055.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de la granja Allué (Sucs, Lleida).

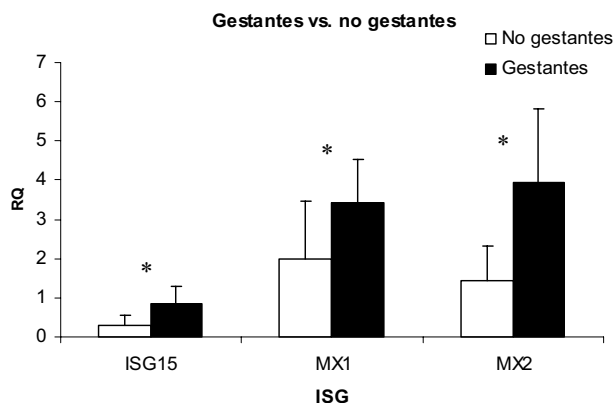


Figura 1. Medias (\pm desviación estándar) de la expresión relativa (RQ) de los genes estimulados por el interferón tau (ISGs) en vacas gestantes ($n=7$) y no gestantes ($n=7$). * $p<0,05$.

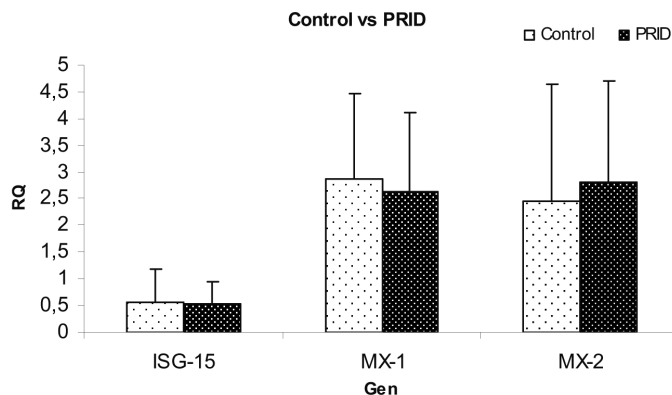


Figura 2. Medias (\pm desviación estándar) de la expresión relativa (RQ) de los genes estimulados por el interferón tau (ISGs) en vacas control ($n=5$) y tratadas con implantes de progesterona ($n=9$).

EFFECTS OF PROGESTERONE SUPPLEMENTATION POST ARTIFICIAL INSEMINATION ON THE EXPRESSION OF INTERFERON TAU (IFN- τ)-STIMULATED GENES IN DAIRY COWS: A PRELIMINARY STUDY

ABSTRACT: Progesterone is essential for the preparation of the endometrium and the maintenance of pregnancy, so supplementation with progesterone after artificial insemination (AI) could increase fertility in lactating dairy cows. The aim of this study was to determine the effects of treatment with a progesterone intravaginal device (PRID) between Days 16 and 19 post-AI on the expression of the genes ISG15, Mx1 and Mx2. On Day 16 post-AI, lactating dairy cows were randomly allocated to one of two groups, control ($n=5$) or treatment ($n=9$) with a PRID for 3 days. Blood samples were collected on Day 20 after AI and the expression of genes in peripheral mononuclear cells was determined by RT-qPCR. The overall pregnancy was 50% (7/14). Cows diagnosed as pregnant had a higher gene expression of ISG15, Mx1 and Mx2 compared to those non-pregnant ($p<0.05$). Supplementation with progesterone post-IA did not affect the expression of ISG, Mx1 and Mx2 on Day 20 post-IA. Further studies are needed to clarify the effect of progesterone treatment on ISGs.

Keywords: Dairy cows, progesterone, interferon-stimulated genes, fertility.

CALIDAD SEMINAL DE EYACULADOS FRESCOS DE LA RAZA CABRA BLANCA DE RASQUERA

Orus, A., Ventós, A., Tabarez, A., García, W., Osuagwuh, U. y Palomo M.J.¹
¹Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona.
mariajesus.palomo@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La Cabra Blanca de Rasquera tiene su origen en las Tierras del Ebro. Todavía considerada como una agrupación racial al no estar reconocida oficialmente como raza, es la única población caprina autóctona de Cataluña, por lo que constituye el último reducto de patrimonio genético caprino en esta comunidad autónoma. De aptitud cárnica, se destina principalmente a la producción de cabritos, destacando por su gran rusticidad, que le ha permitido adaptarse a las condiciones orográficas y climatológicas de las comarcas del sur de Cataluña (Jordana et al., 2009; 2010). De acuerdo con el último censo poblacional, tan solo existen unos 6.000 ejemplares de los 30.000 que se llegaron a contabilizar en la década de los cincuenta, por lo que se encuentra actualmente en peligro de extinción. Su futuro es incierto ya que la mayoría de las explotaciones pertenecen a ganaderos que no pueden garantizar la continuidad del rebaño (Jordana et al., 2010). No obstante, en el año 2003 se inició un Programa de Conservación, financiado por la Generalitat de Catalunya en colaboración con la Facultad de Veterinaria de Barcelona para analizar y caracterizar racialmente esta agrupación, elaborándose una propuesta de estándar racial como base para iniciar los trabajos de publicación del Libro Genealógico (Carné et al., 2005; Torres, 2007; Jordana et al., 2009). Paralelamente y gracias a un proyecto financiado por el INIA se inició también su conservación “*ex situ*”, mediante el almacenamiento criogénico de semen de machos seleccionados por su capacidad de aportar variabilidad genética a la raza.

Así, consideramos que la valoración rutinaria de contrastación seminal de los machos, en concreto de la raza Cabra Blanca de Rasquera, es uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en los distintos programas de conservación de las razas o agrupaciones raciales en peligro de extinción, ya que además de aportar un mayor conocimiento de las características de las distintas razas, nos permite estimar el número de dosis por macho que podríamos disponer para su futura utilización mediante la inseminación artificial con el objetivo, no solo de incrementar el censo de la raza, sino que además, en nuestro caso, de aumentar la variabilidad genética en las distintas poblaciones de origen, donde la consanguineidad es altamente preocupante. Que sepamos, no se han realizado estudios sobre las características seminales de esta cabra, por lo que en el presente trabajo se pretende aportar algunos aspectos sobre la calidad seminal de la cabra Blanca de Rasquera a partir de los sementales de más de 3 años utilizados para la creación de este banco. Con ello se pretende contribuir a una mejor caracterización de esta agrupación racial.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries* (IRTA) en Torre Marimon (Caldes de Montbui, Barcelona), donde están alojados los machos de la raza Cabra Blanca de Rasquera seleccionados por su capacidad de aportación de variabilidad genética a la raza. A la edad de 3 años, se les colectó semen rutinariamente a un ritmo de 2 extracciones por día y 1 ó 2 días por semana en otoño, utilizando 7 sementales adiestrados para la extracción de semen mediante vagina artificial. Inmediatamente después a la recogida del semen, se evaluó el volumen de cada eyaculado en un tubo graduado y la motilidad masal del semen en una escala del 0 al 5 (Evans y Maxwell, 1990). A continuación se mezclaron los dos eyaculados obtenidos de cada semental, se registró el volumen total y se procedió a realizar el resto del análisis seminal a partir de esta mezcla de eyaculados. Concretamente se valoró la concentración espermática en cámaras de recuento celular, mientras que la viabilidad espermática, integridad del acrosoma y morfología de los espermatozoides frescos se analizó mediante la tinción vital eosina/nigrosina (Hancock, 1951). Asimismo se analizó la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides frescos mediante el test hipoosmótico (*hyposmotic swelling test*, HOS test), el cual consistió en la incubación de una alícuota de la suspensión

de espermatozoides en una solución hipotónica (100 mOsm) a 37°C durante 30 min (Forouzanfar et al., 2010). Tras la incubación se evaluó la capacidad de resistencia al shock hiposmótico con la misma tinción de eosina-nigrosina mediante su observación en el microscopio óptico a 1000x, determinando el porcentaje de espermatozoides vivos. Finalmente, los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), en un diseño factorial, teniendo como factor el individuo y realizando un total de 12 repeticiones. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$), se realizó el test de Bonferroni de comparación de medias a posteriori. Los resultados se expresan como media \pm SD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis seminal de los eyaculados frescos de los 7 ejemplares de cabra Blanca de Rasquera seleccionados mostró unos valores de volumen de eyaculado de $0,86 \pm 0,36$ mL y de motilidad masal de $4,23 \pm 0,57$ en el primer salto y de $0,77 \pm 0,28$ mL y $4,34 \pm 0,57$ en el segundo salto, respectivamente. Asimismo, a partir de la mezcla de los 2 saltos obtenidos en cada macho, se observó que éstos presentaban una calidad seminal semejante, no mostrando diferencias en la concentración de espermatozoides/mL ($2445,42 \pm 848,14$ millones), ni tampoco en el porcentaje de viabilidad espermática obtenida mediante la tinción eosina/nigrosina ($79,23 \pm 11,6\%$). En cuanto al porcentaje de espermatozoides que presentaban el acrosoma dañado ($15,01 \pm 9,59\%$) u otra anomalía morfológica ($3,19 \pm 2,71\%$), los valores obtenidos también fueron similares entre los distintos machos, así como su capacidad de resistencia al shock hiposmótico ($61,42 \pm 18,22$). Únicamente, uno de ellos (macho nº 7) presentó un volumen total de semen significativamente superior ($p < 0,05$) al resto, tal como se muestra en la tabla 1.

En términos generales, la calidad espermática de los eyaculados utilizados en el presente trabajo es ligeramente inferior a la observada por otros autores en otras razas caprinas como la Murciano-Granadina (Roca et al., 1992), la Verata o la Malagueña (Pérez y Mateos, 1996), así como la Alpina o Saanen (Karagiannidis et al., 2000), pero bastante más próxima a la descrita en la raza Blanca-Celtibérica (Jiménez-Rabadán et al., 2012), probablemente debido a la escasa presión de selección que sufren estas razas autóctonas, actualmente en peligro de extinción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carné S, Roig N, Jordana J (2005). *V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe*. Montevideo (Uruguay). Libro de resúmenes; 106.
- Evans G, Maxwell WMC (1990). España. Acribia.
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH (2010). *Theriogenology*; 73: 480-487.
- Hancock JL (1951). *Nature*; 167: 323-324.
- Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ (2012). *Animal Reproduction Science*; 132: 88-95.
- Jordana J, Parés PM, Such X (2009). En: *Guía de Campo de las Razas Autóctonas Españolas*. Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino; 188-190.
- Jordana J, Vidilla M, Ferrando A (2010). *Dossier Tècnic*; 43: 31-35.
- Karagiannidis A, Varsakeli S y Karatzas G (2000). *Theriogenology*, 53: 1285–1293.
- Pérez B y Mateos E (1996). *Small Ruminant Research* 23, 23-28.
- Roca J, Martínez E, Vázquez JM y Coy P (1992). *Anim. Reprod. Sci.*, 29: 255- 262.
- Torres E (2007). En: *Libro Conmemorativo del Centenario del Cuerpo Nacional Veterinario*. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 333-343

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el INIA (RZ2009-00008-00-00), la Generalitat de Catalunya (2009SGR0621 y CUR-DIUE), el Fondo Social Europeo y la Fundación Carolina.

Tabla 1. Parámetros de calidad del semen fresco de machos cabríos de la raza Cabra Blanca de Rasquera tras la mezcla del primer y segundo eyaculado

Nº ♂	Volumen total (ml)	Concentr. (x 10 ⁶ /ml)	Motilidad Masal	Viabilidad (%)	Acrosoma Dañado (%)	Forma Anormal (%)	HOST (%)
1	1,36±0,15 ^a	2994±397	4,21±0,20	80,86±2,38	13,71±2,44	3,41±1,01	63,11±6,73
2	1,61±0,26 ^a	2073±248	3,92±0,31	75,65±3,03	17,36±2,59	3,77±0,87	55,20±6,87
3	1,50±0,11 ^a	2309±166	4,11±0,16	75,08±3,73	17,44±2,36	4,16±1,16	54,40±5,01
4	1,70±0,14 ^a	2420±657	4,21±0,18	78,70±4,68	16,61±4,54	1,67±0,34	60,89±5,11
5	1,17±0,09 ^a	2677±232	4,68±0,13	86,11±1,85	9,30±1,57	3,47±0,82	73,26±3,01
6	1,67±0,13 ^a	2345±304	4,14±0,12	84,31±2,00	12,24±1,93	2,13±0,64	64,96±5,45
7	2,32±0,14 ^b	2388±259	4,50±0,13	74,95±4,33	17,80±3,33	2,81±1,80	56,97±4,32

a,b Diferentes letras en una misma columna significa valores (media±error estándar, n=12) significativamente diferentes (P<0'05).

SEMEN QUALITY OF FRESH EJACULATES FROM CABRA BLANCA DE RASQUERA BREED

ABSTRACT: *Blanca de Rasquera* is a Catalanian breed of goat facing extinction. In 2003, its preservation programme started, and few years later, a sperm bank from breeders according to their genetic variability was constituted. Therefore, in order to increase our knowledge on this local breed as regards creating a sperm cryobank, a study on fresh semen quality was done. Semen was collected twice a day via artificial vagina in an interval of 1 to 2 days per week in autumn from 7 males (3 years old). Ejaculates were evaluated for volume and mass motility using conventional method, acrosome integrity, sperm viability and morphology were analyzed by eosin/nigrosin stain, and plasma membrane function was assessed by hypo-osmotic swelling test. Results (mean±SD) showed a volume about 0.86±0.36 mL and mass motility of 4.23±0.57 (scale 0-5) in the first ejaculate, and a volume of 0.77±0.28 mL and mass motility of 4.34±0.57 in the second ejaculate, respectively. No significant difference between individual male results was observed in the sperm concentration (2445.42±848.14 x 10⁶ sperm/mL), sperm viability (79.23±11.6%), and damaged acrosome cells (15.01±9.59%). Morphological abnormalities were low (3.19±2.71%) and resistance to hyposomotic shock was 61.42 % (±18.22). Only one buck produced a significant high total volume.

Keywords: Rasquera goat, sperm analysis.

DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS SEMINALES DEL CONEJO IBICENCO

Sánchez-Rodríguez A.¹, Masdeu M.¹, García-García R.M.¹, Arias-Álvarez M.²,
Lorenzo P.L.¹, Rebollar P.G.³

¹ Departamento de Fisiología (Fisiología animal) y ² Producción Animal, Fac. Veterinaria, UCM. ³ Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agrónomos, UPM. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid. pilar.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

El conejo ibicenco es una especie no seleccionada presente en las islas Baleares. Las asociaciones de criadores (Federación Pitiusa de Razas Autóctonas, www.razas-autoctonas.com/conejo) persiguen constituirlo como raza autóctona e inscribirlo en el Libro Genealógico, para promover su conservación y evitar su extinción. Para ello, es necesario hacer una caracterización y establecer los estándares raciales desde un punto de vista reproductor, entre otros. En el caso del macho, es fundamental la determinación de parámetros seminales, tanto macroscópicos como microscópicos, que ha sido el objetivo del presente estudio. Además se ha estudiado la influencia del orden de salto y el efecto de la edad del animal sobre dichos parámetros seminales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 conejos ibicencos de entre 5 y 17 meses de edad alojados en jaulas individuales (700 mm × 500 mm × 320 mm) en la granja experimental de la UPM (20-25°C, horas luz:oscuridad 16:8), con alimentación y agua *ad libitum*. Todos ellos fueron entrenados al salto un mes antes del inicio de la prueba y tras ello se recogieron, durante dos meses, dos eyaculados sucesivos con vagina artificial siguiendo un régimen extensivo: un día a la semana con una separación de 15-20 minutos entre ambos (Arroita et al., 2000). Una vez recogidos, se anotó la presencia de orina o de sedimento (descartando los eyaculados en los que estaban presentes), el volumen y la presencia o no de gel, que se eliminó de la muestra. Después, se unieron ambos eyaculados y se realizó una dilución 1:5 con un diluyente atemperado (Cudil Magapor®, Zaragoza, España). En el transcurso de una hora tras la extracción, se valoró la motilidad seminal utilizando un sistema computerizado de análisis de semen (SCA, Computer Assisted Sperm Analysis®, Barcelona, España) ajustando el programa informático a muestras de conejo, así como la dilución final del semen a 1:20. De cada muestra, en un mínimo de 250 espermatozoides se evaluó: el porcentaje de espermatozoides estáticos, móviles progresivos y no progresivos, la velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), la velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), la velocidad media de la trayectoria (VAP, $\mu\text{m/s}$), la linealidad de la trayectoria curvilínea ($\text{LIN}=\text{VSL}/\text{VCL}$) y la rectitud de velocidad de trayectoria ($\text{STR}=\text{VSL}/\text{VAP}$). Por otro lado, una muestra de los eyaculados se fijó con glutaraldehído 0.25% (Lavara et al., 2013) para determinar la concentración en cámara de Neubauer y el porcentaje de espermatozoides anormales contando un total de 100 células.

Se determinó el efecto del orden de salto en los parámetros macroscópicos (coloración del eyaculado, presencia o no de sedimento y gel) mediante el procedimiento CATMOD con el programa informático SAS/STAT (2002, Cary, NC, USA). También se estudió la correlación entre el volumen del primer y segundo eyaculado mediante el test de Pearson. Asimismo, para determinar el efecto de la edad sobre los parámetros seminales, los eyaculados se dividieron en dos grupos: de animales puberales (<10 meses, n=41) y de adultos (≥ 10 meses, n=45). Este efecto se analizó mediante un procedimiento MIXED con medidas repetidas para los parámetros cuantitativos (concentración, volumen y medidas del SCA) y mediante el procedimiento CATMOD para los parámetros cualitativos (presencia de gel o sedimento y color).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 92,2% de las ocasiones se recogieron 2 eyaculados de cada animal y se analizaron un total de 154 eyaculados. En la Figura 1 se muestra el efecto del orden de salto sobre los parámetros seminales cualitativos. En el primer salto, el porcentaje de eyaculados con presencia de gel es significativamente mayor ($P<0,0001$) y tiende a presentar sedimento ($P=0,07$) en más ocasiones que en el segundo. Nuestros

resultados coinciden con Holtz y Foote (1978) y posiblemente esto ocurra porque en el primer salto se eyacule la mayoría del contenido de gel acumulado en las glándulas accesorias y en 15-20 minutos no haya tiempo suficiente para que se produzca más gel. Sin embargo, en conejo de monte criado en cautividad, Dávila et al. (2003), observaron un menor porcentaje de eyaculados con gel (30%) y fue similar en ambos saltos. La mayor presencia de gel en los eyaculados del conejo ibicenco podría tratarse de una característica racial. La presencia de sedimento en el primer eyaculado podría explicarse por el arrastre de células descamadas de la uretra pelviana. Por otro lado, la aparición de eyaculados de color amarillo que indicaban la presencia de orina, fue independiente del orden de salto aunque sí se observó una tendencia a una mayor presencia de este tipo de eyaculados en conejos puberales con respecto a los adultos (8,44 vs. 3,25 %; $P=0,07$), debido probablemente a la falta de entrenamiento en el salto, por su menor edad. El análisis estadístico mostró una escasa correlación ($r^2 = 0,11$) entre el volumen de los dos eyaculados sucesivos.

En general, la productividad y las características seminales varían ampliamente entre líneas, razas, edades y manejo reproductivo de los conejos (Castellini et al., 2006). En este sentido, podemos decir que los valores de los parámetros cuantitativos obtenidos en este estudio se encuentran en unos rangos de gran amplitud debido a una elevada variabilidad individual entre animales (Tabla 1).

Los valores de concentración con respecto a la edad de los animales (Figura 2), están en concordancia con la bibliografía consultada. En líneas seleccionadas García et al. (2004) afirma que la concentración espermática evoluciona con la edad, siendo mayor entre los 10 y 18 meses de edad, mientras que el porcentaje de espermatozoides anormales es menor entre los 19 y 25 meses de vida. El porcentaje de anomalías espermáticas ha sido significativamente mayor ($P<0,01$) en el grupo de animales puberales, con una elevada variabilidad individual y apareciendo los valores más altos en los individuos más jóvenes (de 3 a 6 meses de edad).

Los parámetros VCL, VSL y VAP variaron significativamente ($P<0,001$, $P<0,01$ y $P<0,01$, respectivamente) en función de la madurez sexual del animal, apareciendo aumentados en el grupo de individuos puberales. Así, a pesar de tener mayor porcentaje de anomalías espermáticas, los espermatozoides de los conejos más jóvenes tienen mayor velocidad que los de los conejos adultos. Los valores obtenidos de STR están dentro de los valores encontrados en la bibliografía (Boiti et al., 2005). Este trabajo constituye un estudio preliminar de caracterización de parámetros seminales del conejo ibicenco. El orden de salto influyó sobre la presencia de gel y sedimento, siendo mayores en el primer eyaculado. Asimismo, la edad afectó a algunos de los parámetros, como la velocidad espermática y el porcentaje de anomalías espermáticas que fueron mayores en los conejos más jóvenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroita et al., 2000. 7th World Rabbit Congress. A, 81-87.
- Boiti et al., 2005. World Rabbit Sci, 13: 71-91.
- Castellini et al., 2006. En: Recent advances in Rabbit Science. Maertens and Coudert eds.
- Dávila et al., 2003. XXVIII Symposium de Cunicultura, 127-134.
- García et al., 2004. Boletín de cunicultura, 135: 17-25.
- Holtz y Foote, 1978. Biol. Reprod., 18: 286-292.
- Lavara et al., 2013. Theriogenology. 80: 313-318.

Agradecimientos: B. Velasco y HCV-UCM por el acceso al SCA. Financiado por INIA (RZ2010-00012-00-00).

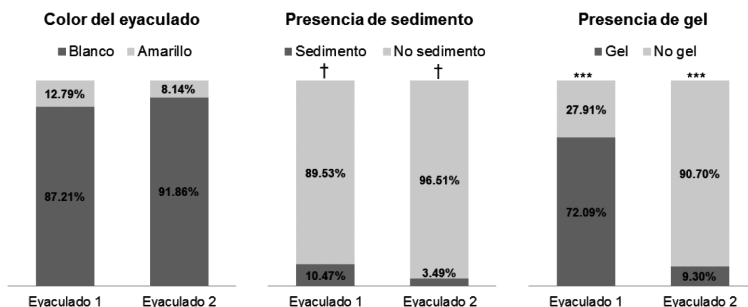


Figura 1. Efecto del orden del eyaculado sobre los parámetros seminales cualitativos de conejos ibicencos (†: $P=0,07$; ***: $P<0,0001$).

Tabla 1. Rangos de valores de parámetros seminales cuantitativos en conejo ibicenco ($n=154$). *Volumen total extraído en el día formado por dos eyaculados. esp: espermatozoides

Volumen (ml)	Concentración (mill esp/ml)	% Anormales	% Estáticos	% Progresivos	Mot. Total ($\mu\text{m/s}$)
0,8–2,1*	63–710	7,9–69,2	8,7–70,4	12,3–63,3	29,7–91,3
VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (VSL/VCL)	STR (VSL/VAP)	
72,1–107,1	25–54,4	35,8–69,4	34–52	63,6–81,3	

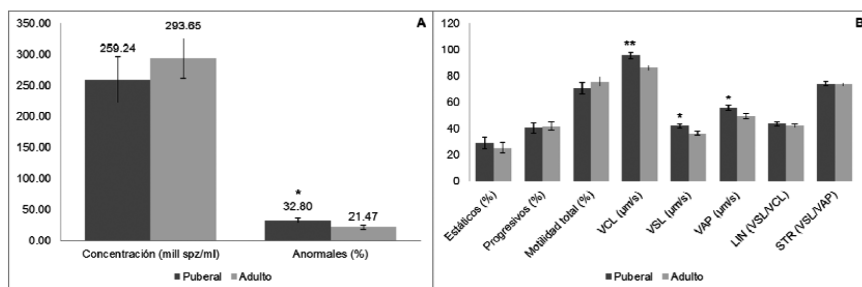


Figura 2. Efecto de la edad (puberales: <10 m; $n=41$ y adultos: ≥ 10 m; $n=45$) sobre A) concentración y porcentaje de formas anormales y B) parámetros seminales determinados mediante CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) en eyaculados de conejo * $P<0,01$; ** $P<0,001$

DESCRIPTION OF SEMINAL PARAMETERS IN IBICENCO RABBIT

ABSTRACT: The ibicenco rabbit is an endangered species and it has to be consolidated as a breed. Therefore, male reproductive characteristics must be standardized, which was the objective of this study. We also determined the effect of the sexual maturity stage (puberal <10 months; adults ≥ 10 months) and the effect of the ejaculate order in seminal characteristics. Two ejaculates were collected weekly during 2 months and qualitative and quantitative parameters were measured. There was a high individual variability in quantitative parameters, but they correspond to the literature. Some differences have been found in qualitative parameters, like the higher presence of gel in the first ejaculate, and in quantitative parameters, such as the higher percentage of abnormal spermatozoa but a higher velocity in sperm of puberal rabbits. This study constitutes the first steps to the completely characterization of semen quality in ibicenco rabbit.

Keywords: ibicenco rabbit, sperm, evaluation, CASA

UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN MORUECOS DE ALTA Y BAJA FERTILIDAD EN CAMPO

Yániz, J.L., Palacin, I., Vicente-Fiel, S., Sánchez-Nadal, J.A., Santolaria, P.
Grupo de investigación TECNOGAM, Instituto IUCA, Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N 22071 Huesca. jyaniz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La capacidad predictiva de los análisis de calidad seminal sobre la fertilidad potencial de machos y eyaculados debe mejorarse. La información incompleta proporcionada por el análisis está detrás de esta capacidad restringida para lograr predicciones precisas. En este sentido, aunque la existencia de las subpoblaciones de espermatozoides en el eyaculado es ampliamente reconocida (Holt y Van Look, 2004), la mayoría de estudios han abordado el análisis de la relación entre los parámetros de calidad seminal y la fertilidad del macho basándose en datos medios. El interés en las subpoblaciones espermáticas proviene de la evidencia creciente de que la heterogeneidad de las mismas puede tener relevancia funcional y relacionarse con la fertilidad (de Paz et al., 2011; Ramón et al., 2013). Teóricamente, una mayor heterogeneidad de espermatozoides garantizaría mayor potencial para fecundar un ovocito a intervalos impredecibles después de la eyaculación (Curry, 2000).

En el morueco, algunos estudios han descrito la existencia de subpoblaciones morfométricas y cinéticas. Sin embargo, que sepamos, solamente hay un estudio en el que se evaluó la posible asociación entre las subpoblaciones morfométricas y la fertilidad (de Paz et al., 2011) y ninguno que haya evaluado este aspecto en lo referente a las subpoblaciones cinéticas en esta especie. En un trabajo reciente en ovino, describimos una relación entre varios parámetros de calidad seminal, utilizando los valores medios, y la fertilidad en campo en ovino (Vicente-Fiel et al., 2014). El objetivo del presente estudio fue investigar si las diferencias en la fertilidad de los moruecos se relacionan con la estructura poblacional de los espermatozoides. Además se estudió la posible asociación entre las subpoblaciones cinéticas y morfométricas por primera vez en esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen se recogió semanalmente con la ayuda de una vagina artificial de 8 moruecos adultos de la raza Rasa Aragonesa, 4 de alta y 4 de baja fertilidad en campo, durante 6 semanas consecutivas. Se estableció una rutina de recogida del semen de dos veces por semana, aunque solo se utilizó un eyaculado por macho y semana en el estudio y el otro fue descartado. Los moruecos se clasificaron previamente como de alta y baja fertilidad basándonos en los odds-ratio de un estudio epidemiológico previo (Palacin et al., 2012). Las muestras de semen se diluyeron hasta 50×10^6 espermatozoides/mL usando INRA96 © para la evaluación de la motilidad espermática (Vicente-Fiel et al., 2014) o se prepararon para la evaluación de la morfometría espermática como se describió anteriormente (Yániz et al., 2012).

Los valores obtenidos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete SPSS, versión 15.0. El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0.05$. Se utilizaron procedimientos clúster para identificar las subpoblaciones de espermatozoides utilizando datos cinéticos o morfométricos como se describió en Vicente-Fiel et al., (2013). Después de caracterizar las subpoblaciones espermáticas, se realizó un análisis de correlación de dos vías incluyendo todas las subpoblaciones para explorar posibles asociaciones entre la morfometría y velocidad espermáticas. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para explorar las relaciones entre la proporción de cada subpoblación de espermatozoides en la muestra seminal y la fertilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis clúster reveló la presencia de tres subpoblaciones cinéticas en moruecos: la subpoblación 1 (SP1mot) comprende espermatozoides lentos, no lineales y con baja ALH. La subpoblación 2 (SP2mot) incluye espermatozoides rápidos y lineales. En el mismo sentido, la subpoblación 3 (SP3mot) está formada por espermatozoides rápidos, no lineales y con alta ALH. De los espermatozoides móviles totales, 17,9%, 53,1% y 29,0% se incluyeron

en las subpoblaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Las tres subpoblaciones cinéticas descritas son similares a las de un estudio previo en la raza ovina Manchega (García-Alvarez et al., 2013).

En relación a los parámetros morfométricos, el análisis clúster reveló la presencia de tres subpoblaciones: la subpoblación 1 (SP1morpho) incluye espermatozoides pequeños (baja P, L, W). A la subpoblación 2 (SP2morpho) pertenecen espermatozoides de tamaño medio y con forma redondeada. La subpoblación 3 (SP3morpho) está formada por espermatozoides grandes y largos. De los espermatozoides totales, el 17,8, 34,8 y 47,0% se incluyeron en las subpoblaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Estas subpoblaciones coinciden con las descritas en un estudio reciente de nuestro grupo, donde se identificaron tres subpoblaciones morfométricas utilizando el método de CASMA-F (Vicente-Fiel et al., 2013).

Los moruecos de alta fertilidad mostraron una mayor proporción de espermatozoides con movilidad eficiente (rápida y lineal, SP2mot) y con las cabezas grandes y largas (SP3morpho). Ambas subpoblaciones espermáticas podrían estar relacionadas con una mayor eficiencia migratoria a través del tracto genital femenino. En los ovinos, el cuello uterino y el istmo son las principales barreras para los espermatozoides después de la inseminación cervical (Yániz et al., 2014). En estas estructuras anatómicas, la mucosa epitelial produce moco viscoso que los espermatozoides deben penetrar para llegar al sitio de la fecundación en la unión ampulo-istmica del oviducto. Junto con secreciones viscosas locales, la compleja arquitectura superficial de la mucosa cervical y oviductal (Yaniz et al., 2014) puede dificultar el paso de los espermatozoides. Los eyaculados con una mayor proporción de espermatozoides con un movimiento rápido y lineal probablemente tendrían una migración más eficiente a través del tracto reproductivo femenino. De acuerdo con nuestros resultados, Ramon et al., (2013) observaron que los machos de ciervo con altas tasas de fertilidad tenían eyaculados con altos porcentajes de espermatozoides exhibiendo los movimientos rápidos y lineales. Los espermatozoides con cabeza grande y larga también podrían estar relacionados con una migración más eficiente. En estudios de la competencia espermática, se ha demostrado que todos los componentes del espermatozoide aumentan de tamaño al mismo tiempo, y esto podría estar asociado con una mejor eficiencia migratoria (Tourmente et al., 2011).

Se buscaron posibles correlaciones entre subpoblaciones cinéticas y morfométricas (porcentajes de cada una) para evaluar si los espermatozoides en una subpoblación morfométrica particular tenían un movimiento característico. Encontramos que la proporción de espermatozoides con un núcleo pequeño (SP1morpho) mostró una correlación positiva ($r = 0,32$, $P < 0,05$) con la proporción de espermatozoides con un movimiento lento, no lineal con baja ALH (SP1mot) y una correlación negativa ($r = -0,33$, $P < 0,05$) con la proporción de espermatozoides con un movimiento rápido y lineal (SP2mot). Esta es la primera vez que se estudia la correlación entre el diseño espermático y su cinética de movimiento en ovino. En el ciervo ibérico se ha demostrado que los espermatozoides con movimiento rápido y lineal se correlacionan con los espermatozoides con una cabeza pequeña y alargada, siendo ambas subpoblaciones más frecuentes en machos de alta fertilidad (Ramon et al., 2013). En el presente estudio, sin embargo, los espermatozoides rápidos y lineales y los de núcleos grandes y largos se correlacionaron con la alta fertilidad, pero ambas subpoblaciones no se correlacionaron entre sí. En general puede afirmarse que no se observó una clara correspondencia entre las subpoblaciones morfométricas y cinéticas en el morueco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de Paz, P. 2011. *Theriogenology* 76, 1313-1325.
- García-Alvarez, O. 2014. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 725-732.
- Holt, W.V. 2004. *Reproduction* 127, 527-535.
- Palacín, I. 2012. *Anim. Reprod. Sci.* 132, 139-144.
- Ramon, M. 2013. *Biol. Reprod.* 89, 110.
- Tourmente, M. 2011. *B.M.C. Evol. Biol.* 11, 1-10.
- Vicente-Fiel, S. 2013. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 182-189.
- Vicente-Fiel, S. 2014. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 15-20.
- Yániz, J.L. 2012. *Theriogenology* 77, 1343-1350.

Agradecimientos: Los autores agradecen al CITA (DGA) por su ayuda con la adquisición de muestras de semen. Este trabajo fue financiado por el MINECO Español (proyectos IPT-010000-2010-33 y AGL2011-30353-C02-01) y la DGA-FSE (proyecto A40).

A COMPARATIVE STUDY OF SPERM SUBPOPULATIONS IN HIGH AND LOW FIELD FERTILITY RAMS

ABSTRACT: The aim of the present study was to investigate whether differences in field fertility of rams are reflected in differences in sperm morphometric and kinematic population structure. The association between sperm morphometric and kinematic subpopulations was also investigated. Ejaculates from 8 adult rams, 4 with high and 4 with low field fertility, were collected weekly using an artificial vagina over 6 consecutive weeks. Analyses of sperm motility using computer-assisted sperm analysis (CASA) and sperm nuclear morphometry using computer-assisted sperm morphometry-fluorescence were performed. Clustering procedures using the kinematic and morphometric data from high and low field fertility rams resulted in the classification of spermatozoa in three kinematic and three morphometric sperm subpopulations. The distribution of subpopulations between rams of high and low field fertility was significantly different, with higher percentages of spermatozoa exhibiting fast and linear movements and those with large and long nuclei in the high fertility group. However, these subpopulations were not correlated. It was concluded that high and low fertility rams present clear differences in sperm population structure.

Keywords: sheep, sperm subpopulations, CASA, CASMA

EFFECTO DEL FLUIDO UTERINO Y DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE PORCINA

Abril-Sánchez, S., Soriano-Úbeda, C., Matás, C., García-Vázquez, F.A.¹
Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia
Campus *Mare Nostrum*, 30100, Murcia e IMIB, Murcia. ¹fagarcia@um.es

INTRODUCCIÓN

En la especie porcina, tras una monta natural o inseminación artificial tradicional, los espermatozoides son depositados en la porción intracervical del útero. Desde ahí inician un largo viaje hacia la unión útero-tubárica, pasando por los cuernos uterinos (Hunter, 1981). Durante su transcurso, normalmente se produce una disminución de la población espermática y, aunque se depositan millones de espermatozoides en el tracto genital de la hembra, solamente unos pocos miles alcanzan el oviducto (Sumransap et al., 2007). Esta pérdida de población espermática puede deberse a diversos factores, como la acción fagocítica de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) en el útero (Matthijs et al., 2003; Taylor et al., 2009), el reflujo de semen (Steeverink et al., 1998; Hernández-Caravaca et al., 2012, 2015) u otros factores desconocidos presentes en el fluido uterino (FU) (Kawano et al., 2014). Frente a esto, se ha visto que el plasma seminal (PS) minimiza algunos de estos factores, como por ejemplo el reclutamiento de los PMNs (Rozeboom et al; 1998, 1999), o también manteniendo la funcionalidad espermática por la presencia de algunas proteínas (Centurión et al., 2013). Además, en ratón se ha observado que la presencia de PS implica una mejora de la calidad espermática (motilidad, vitalidad y daño acrosomal), mientras que el FU daña la funcionalidad de los espermatozoides, afectando a la vitalidad, motilidad y membrana acrosomal (Kawano et al., 2014).

Por todo lo dicho, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del FU porcino sobre la calidad de espermatozoides eyaculados (vitalidad, motilidad y daño acrosomal) en presencia o ausencia de PS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de eyaculado se obtuvieron de cerdos de fertilidad probada. Tras la extracción del semen, una parte se destinó a la obtención de PS. Para ello, se centrifugaron las muestras de eyaculado (3200 g, 10 min, 4°C) hasta la eliminación total de restos celulares. Se recolectó el sobrenadante y seguidamente las muestras de PS se alicuotaron y congelaron a -80 °C hasta su uso.

El FU se extrajo de úteros de cerdas que se encontraban en fase folicular tardía (basado en la morfología del ovario según Carrasco et al., 2008) procedentes del matadero “El Pozo Alimentación S.A.” (Alhama de Murcia, Murcia, España). Para la extracción, se realizó una presión mecánica desde la porción craneal (cerca de la unión útero-tubárica) hasta la porción caudal (próxima al cuerpo del útero). El contenido fue recogido en placas *petri* y seguidamente se depositó en tubos *ependorf* para ser centrifugados (7000 g, 10 min, 4°C). Finalmente, se recolectó el sobrenadante y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

Para medir el efecto del FU sobre la calidad espermática en presencia o ausencia de PS, se realizaron 4 grupos experimentales:

- a) Grupo (-/-): grupo control, exento de PS y FU.
- b) Grupo (+/-): 20% de PS, sin FU.
- c) Grupo (-/+): sin PS, 20% de FU.
- d) Grupo (+/+): 20% de PS + 20% FU.

Se ajustó la concentración espermática a 40×10^6 espermatozoides/ml en un volumen final de 500 μ l en PBS (*Phosphate Buffer Solution*). Posteriormente, los grupos experimentales se incubaron a 38°C durante 2 horas. A los 15 min y 1 y 2 horas de incubación se evaluó la motilidad (%) y motilidad progresiva (escala [0-5], donde 0= estáticos; 5= máxima progresividad) de forma subjetiva, así como la vitalidad (eosina/nigrosina) y el daño acrosomal (PNA-FITC, según Kawano et al., [2007]).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la motilidad (%) y vitalidad entre los distintos grupos experimentales (Tabla 1). Sin embargo, en los grupos en los que estaba presente el PS [(+/+) y (+/-)] se apreciaron niveles significativamente mayores ($p < 0,05$) en motilidad progresiva respecto a los grupos en ausencia de PS [(-/-) y (-/+)]. En cuanto al daño acrosomal, a las 2 h de incubación se observó que los grupos sin PS [(-/-) y (-/+)] presentaron porcentajes más elevados ($p < 0,05$) que los grupos con PS [(+/-) y (+/+)]. Respecto a este parámetro, se puede estimar una tendencia creciente, aunque no significativa, en el grupo exento de PS, en presencia de FU (-/+), respecto al grupo control (-/-).

Tabla 1. Parámetros de motilidad (%), motilidad progresiva (0-5), vitalidad (%) y daño acrosomal (%) medidos en diferentes tiempos de incubación (15 min, 1h y 2h) en espermatozoides con FU y/o PS. Los datos se expresan como Media \pm error típico.

Tiempo incubación	Grupos	Motilidad (%)	Motilidad Progresiva (0-5)	Vitalidad (%)	Daño Acrosomal (%)
15 min	(-/-)	82,00 \pm 2,54	2,30 \pm 0,14 ^a	87,33 \pm 1,45	10,00 \pm 1,00 ^a
	(+/-)	84,00 \pm 1,87	2,75 \pm 0,07 ^b	87,00 \pm 1,52	1,00 \pm 0,00 ^b
	(-/+)	85,00 \pm 1,58	2,40 \pm 0,12 ^{ab}	87,66 \pm 2,33	7,33 \pm 0,88 ^a
	(+/+)	85,00 \pm 1,58	2,80 \pm 0,05 ^b	87,66 \pm 3,17	1,33 \pm 0,33 ^b
1h	(-/-)	77,00 \pm 1,22	2,00 \pm 1,76 ^a	83,00 \pm 1,52	11,33 \pm 1,76
	(+/-)	82,00 \pm 1,22	2,70 \pm 0,05 ^b	85,00 \pm 0,57	3,33 \pm 1,85
	(-/+)	80,00 \pm 0,00	2,45 \pm 0,16 ^{ab}	81,33 \pm 1,33	11,33 \pm 2,84
	(+/+)	83,00 \pm 1,22	2,80 \pm 0,05 ^b	86,00 \pm 1,52	5,66 \pm 2,33
2h	(-/-)	72,00 \pm 4,06	2,00 \pm 0,15 ^a	84,00 \pm 0,57	12,66 \pm 2,40 ^{ab}
	(+/-)	81,00 \pm 2,44	2,70 \pm 0,05 ^b	82,00 \pm 1,52	4,00 \pm 0,57 ^c
	(-/+)	75,00 \pm 1,58	2,30 \pm 0,09 ^a	76,66 \pm 4,40	19,00 \pm 1,00 ^a
	(+/+)	80,00 \pm 2,73	2,70 \pm 0,05 ^b	81,66 \pm 1,66	9,00 \pm 1,00 ^{bc}

Todos los datos fueron analizados por ANOVA ($p < 0,05$), comparando las medias entre los grupos experimentales en un mismo tiempo de incubación.

Letras diferentes en una misma columna en un mismo tiempo de incubación indican diferencias significativas.

$n=5$: número de replicados realizados para los parámetros de motilidad (%) y motilidad progresiva.

$n=3$: número de replicados realizados para los parámetros de vitalidad (%) y daño acrosomal (%).

Por un lado, el daño acrosomal, producido por el FU sobre espermatozoides sin PS, puede ser uno de los factores que presenta el tracto genital femenino para la eliminación (selectiva o al azar) de carga espermática durante su paso por los cuernos uterinos, en la especie porcina. De igual forma, se han detectado factores similares en otras especies, como por ejemplo en roedores, donde se ha observado que el FU aumenta el daño acrosomal o reacción acrosómica prematura, disminuye la vitalidad así como los parámetros de motilidad en las células espermáticas (Kawano et al., 2014). Por otra parte, se observa que el PS mejora la funcionalidad espermática, manteniendo la progresividad y la integridad de la membrana acrosomal, incluso en presencia de FU. Algo similar ha sido observado en roedores, donde el PS protege a los espermatozoides de los efectos nocivos del FU, impidiendo daño acrosomal o reacción acrosómica prematura y manteniendo los niveles de vitalidad y motilidad altos. También se ha visto un efecto beneficioso del PS en ovino (Rickard et al., 2014), donde se ha observado que el PS mejora el tránsito de los espermatozoides a través del cuello uterino. Respecto al efecto del PS en la especie porcina, otros autores (Centurion et al., 2003) han observado efectos similares a los obtenidos en nuestro estudio. Éstos han detectado que algunas proteínas, denominadas espermadhesinas

(presentes en PS) actúan protegiendo a las células espermáticas de posibles daños externos, preservando la integridad de la membrana, la motilidad y la actividad mitocondrial. Además, también se ha comprobado que el PS posee propiedades inmunosupresoras, un conjunto de antioxidantes y citoquinas que modulan la respuesta inmunológica del tracto genital femenino (Aitken y Baker, 2013).

Tras la valoración de estos resultados se puede concluir que, en la especie porcina, el FU podría influir sobre la funcionalidad espermática, aunque es necesario realizar diversos estudios complementarios. Además, el PS tiene la capacidad de proteger a las células espermáticas de un daño acrosomal y de mejorar la motilidad, optimizando la linealidad y progresividad. Una de las posibles aplicaciones en granja derivadas de este estudio, sería el uso de dosis seminales con una mayor proporción de plasma seminal que las actuales, ya que mejoraría la calidad de las mismas tras la deposición del semen en el tracto genital de la hembra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, R.J. & Baker, M.A. 2013. *J. Reprod. Immunol.* 100, 11-19.
- Carrasco et al., 2008. *Reproduction.* 136, 833-842.
- Centurion et al., 2003. *Biol. Reprod.* 69, 640-646.
- Hernández-Caravaca et al., 2012. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 14-22.
- Hernández-Caravaca et al., 2015. *Theriogenology.* In press.
- Hunter, R.H.F. 1981. *J. Reprod. Fertil.* 63, 109-117.
- Kawano et al., 2014. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4145-4150.
- Kawano et al., 2007. *Biol. Reprod.* 76, 353-361.
- Matthijs et al., 2003. *Reproduction.* 125, 357-267.
- Rickard et al., 2014. *Reproduction.* 248, 469-478.
- Rozeboom et al., 1998. *J. Reprod. Fertil.* 114, 195-199.
- Rozeboom et al; 1999. *J. Anim. Sci.* 77, 2201-2206.
- Steinerink et al., 1998. *Anim. Reprod. Sci.* 51, 109-119.
- J. Reprod. Fertil. 114, 195-199.
- Taylor et al., 2009. *Anim. Reprod. Sci.* 115, 279-289.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio Español de Economía y Competencia (MINECO) y por el Fondo de Desarrollo Regional Europeo (FEDER; código del proyecto, AGL2012-40180-C03-01).

EFFECT OF UTERINE FLUID AND SEMINAL PLASMA ON QUALITY PORCINE SPERM

ABSTRACT: The aim of the present study was to analyze the effect of the uterine fluid (late follicular phase) on sperm quality with or without seminal plasma. Four experimental groups were used: 1) (-/-): spermatozoa incubated without seminal plasma and uterine fluid (control group); 2) (+/-) spermatozoa incubated with 20% of seminal plasma and without uterine fluid; 3) (-/+) spermatozoa incubated without seminal plasma and with 20 % of uterine fluid, 4) (+/+): spermatozoa with seminal plasma (20%) and uterine fluid (20%). Motility (%), progressive motility (scale [0-5], 0= non motile; 5= high progressivity), vitality and acrosomal damage were measured at 15 min, 1 and 2 hour of incubation. Results showed that seminal plasma has a positive effect on sperm quality, improving linearity and progressive motility. Besides, seminal plasma prevents acrosomal damage. On the other hand, the uterine fluid doesn't affect any of these parameters (motility, progressive motility and vitality). Although, the uterine fluid whether affects acrosomal integrity in absence of seminal plasma. Therefore, the adding of seminal plasma to insemination seminal doses could be a strategy to improve artificial insemination efficiency.

Keywords: motility, porcine, seminal plasma, uterine fluid.

VARIACIÓN ESTACIONAL EN EL PERFIL PROTEICO DEL PLASMA SEMINAL DE DOS LÍNEAS DE CONEJOS

Casares-Crespo, L., Talaván, A.M. y Viudes-de-Castro, M.P.
CITA-IVIA. Polígono de la Esperanza, nº 100. 12400. Segorbe (Castellón).
viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

Las diferencias de fertilidad tras la inseminación artificial entre razas o machos no siempre pueden ser explicadas mediante la evaluación de la motilidad y la morfología espermática. En conejo se ha observado que semen con parámetros morfológicos y cinéticos similares, proveniente de dos líneas de conejos (A y R), daba lugar a distinta fertilidad y tamaño de camada tras la inseminación con semen fresco o congelado (Vicente et al., 2000; Mocé et al., 2003). El plasma seminal contiene una gran diversidad de proteínas, originadas mayoritariamente por el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias (Arruda-Alencar et al., 2012). Estas proteínas participan en varios eventos relacionados con la función espermática, como la maduración y la capacitación espermática, la estabilización de la membrana espermática y la interacción con el oviducto y el ovocito (Topfer-Petersen et al., 1998; Gwathmey et al., 2006). La diversidad existente en la composición proteica del plasma seminal puede explicar la variación en la capacidad y función reproductiva de distintas especies de mamíferos (Druart et al., 2013). En especies de reproducción estacional se han identificado proteínas relacionadas con la fertilidad (Killian et al., 1993; Brandon et al., 1999; Ashrafzadeh et al., 2013), con la resistencia de la membrana espermática al choque frío (Barrios et al., 2000), con la tolerancia espermática a la congelación (Goularte et al., 2014) y con la calidad seminal (Cardozo et al., 2006; Nandre et al., 2012; Kiso et al., 2013). En conejos, el plasma seminal posee un efecto positivo en el mantenimiento de la motilidad y viabilidad espermática durante su almacenamiento *in vitro* (Castellini et al., 2000). Dicho efecto ha sido asociado con las propiedades antioxidantes del plasma seminal (Arruda-Alencar et al., 2012). En conejo, Viudes-de-Castro et al. (2004) estudiaron la composición proteica del plasma seminal en las líneas A y R y observaron dos bandas específicas de línea en el perfil proteico (41 kDa en la Línea A y 13 kDa en la línea R). Sin embargo, en otro estudio con esas mismas líneas, Safaa et al. (2008) no encontraron diferencias en el perfil proteico. Ambos trabajos se llevaron a cabo en estaciones distintas, el primero de ellos en invierno y el segundo en primavera, lo que podría indicar la posible existencia de variaciones estacionales en la composición proteica del plasma seminal en esta especie. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue el estudio del efecto de la estación sobre la composición proteica del plasma seminal de las líneas de conejo A y R.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron machos pertenecientes a dos líneas de distinto origen genético, 12 machos de la línea A, de aptitud maternal, y 12 machos de la línea R, de aptitud cárnica. Los machos fueron alojados en la granja experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe (CITA-IVIA, Castellón, España). Las muestras seminales se recuperaron semanalmente a lo largo del año 2014 mediante vagina artificial. Los eyaculados fueron evaluados individualmente, tomándose una alícuota para evaluar la motilidad, el estado del acrosoma y las formas anormales presentes. Sólo aquellos eyaculados con valores superiores al 70% de motilidad y con menos del 15% de formas anormales o acrosomas dañados, fueron utilizados para constituir la mezcla heterospermica de cada una de las líneas genéticas, siendo el resto descartados. En total, se usaron 12 mezclas heterospermicas de la línea R y 12 de la línea A (3 mezclas por estación). El plasma seminal se obtuvo centrifugando las muestras a 10500 rpm durante 10 minutos a 22°C. El sobrenadante resultante se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante de esta segunda centrifugación fue almacenado a -80°C hasta su uso. La concentración proteica total del plasma seminal se cuantificó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), utilizando BSA como patrón de proteínas (Smith et al., 1985). Una vez determinada la proteína total, se ajustó la concentración de las muestras a 5 g/L, tras lo cual

se juntaron las tres mezclas correspondientes a cada estación y se prepararon las muestras para llevar a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (4-12%). Brevemente, las muestras fueron diluidas 1:1 con Tampón Laemmli 2x (Sigma-Aldrich), calentadas a 95°C durante 5 minutos y tras dejarlas enfriar se cargaron en el gel. El peso molecular fue estimado utilizando el marcador de pesos ProtoMetrics (National Diagnostics). Las condiciones del SDS-PAGE fueron 250 voltios durante 3 horas. Tras completarse la electroforesis, las bandas proteicas del gel fueron visualizadas mediante la tinción con Azul de Coomassie Colloidal. El perfil proteico resultante fue analizado con el software Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Las diferencias de cantidad relativa de cada banda en función de la línea genética y de la estación del año fueron analizadas mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil electroforético del plasma seminal resultó en múltiples bandas de distinta intensidad que oscilaron entre los 8 y los 250 kDa. Para llevar a cabo el análisis con el software Quantity One 1-D se seleccionaron veintiocho bandas, comunes en todas las muestras (en las dos líneas genéticas y en las cuatro estaciones). Estas veintiocho bandas representaron en promedio el 83% de la intensidad total de cada carril. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la cantidad relativa de las bandas en función de la línea genética y la estación. Entre estas bandas proteicas, ocho bandas resultaron diferentes significativamente entre líneas genéticas, la intensidad o cantidad relativa de las bandas de 236, 228, 217, 188, 169, 124, 29 y 16 kDa fue significativamente distinta entre la línea A y la R. De esas ocho bandas proteicas, la línea A presentaba significativamente valores superiores para seis de ellas, únicamente la de 169 kDa y la de 29 kDa aparecían en mayor proporción en la línea R. En el caso de las estaciones, sólo en la banda de 169 kDa se observaron diferencias significativas, siendo su cantidad relativa significativamente superior en invierno. En caprino, ovino y bovino se han observado variaciones estacionales de proteínas (La Falci et al., 2002, Domínguez et al., 2008; Sharma et al., 2014), si bien, en estas especies las variaciones son más acusadas, ya que mientras algunas proteínas están presentes a lo largo de todo el año, se producen ausencias de determinadas proteínas en función de la estación. Sin embargo, dicha variación no parece afectar a la fertilidad del semen a lo largo del año. Nuestros resultados demuestran la existencia de diferencias en la cantidad relativa de un elevado número de proteínas del plasma seminal de machos pertenecientes a la línea genética A frente a los machos de la línea R a lo largo del año. La presencia diferencial de estas proteínas podría explicar las diferencias de fertilidad observadas entre las dos líneas en trabajos anteriores (Vicente et al., 2000; Safaa et al., 2008). Por otro lado, las variaciones de la cantidad proteica relativa entre estaciones observadas en el presente trabajo coinciden con las observaciones de Nandre et al. (2013) en búfalo, donde encontraron una producción diferencial en verano frente al invierno de cuatro proteínas del plasma seminal, relacionadas con la fisiología del espermatozoide (capacidad de proporcionar una fuente energética, de modular la motilidad, o la capacidad de protección del espermatozoide), que indicaban que en invierno las funciones espermáticas eran más favorables.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que, en el caso del conejo, la composición proteica del plasma seminal varía tanto en función de la línea genética del macho como de la estación, si bien parece que el origen genético tiene un mayor peso en la variación de la composición proteica que la estación del año. No obstante, se precisan más estudios para entender cómo las proteínas del plasma seminal regulan la funcionalidad espermática e identificar aquellas relacionadas con las variaciones de fertilidad en esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arruda-Alencar et al., 2012. Proceedings 10th World Rabbit Congress – September 3 - 6, 2012– Sharm El- Sheikh –Egypt, 395 – 399.
- Ashrafzadeh et al., 2013. Int. J. Mol. Sci. 14,

15860-15877. • Barrios et al., 2000. Biol. Reprod. 63, 1531-1537. • Brandon et al., 1999. Theriogenology, 52(5): 863-873. • Cardozo et al., 2006. Theriogenology 66: 841-50. • Castellini et al., 2000. Anim. Reprod. Sci. 63, 275-282. • Domínguez et al., 2008. Theriogenology, 69: 564-573. • Druart et al., 2013. J. Prot. 91: 13-22. • Estany et al., 1989. Livest. Prod. Sci. 21:67-75. • Estany et al., 1992. Genet. Sel. Evol. 24:527-37. • Goularte et al., 2014. Anim. Reprod. Sci. 146: 165-169. • Gwathmey et al., 2006. Biol. Reprod. 75, 501-507. • Killian et al., 1993. Biol. Reprod. 49, 1202-1207. • Kiso et al., 2013. Plos One, 8(8):e71033. • La Falci et al., 2002. Theriogenology, 57:1035-1048 • Mocé et al., 2003. Theriogenology 60:115-123. • Nandre et al., 2013. Iranian J. Vet. Research, 14(1): 1-8. • Safaa et al., 2008. World Rabbit Science 16:141-148. • Sharma et al., 2014. Reprod. Dom. Anim. 49, 387-391. • Smith et al., 1985. Anal. Biochem. 150:76-85. • Topfer-Petersen et al., 1998. Andrologia, 30. 217-224. • Vicente et al., 2000. VII World Rabbit Congress. Valencia. Vol A:273-277. • Viudes-de-Castro et al., 2004. 8th Annual Conference of ESDAR. Reprod. Dom Anim. 39, 4, pp. 266 (Abstract P13). WARSAW Agricultural University, Polonia.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2013-00058-00-00 del INIA. L. Casares-Crespo ha sido financiada por una beca de formación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y el Fondo Social Europeo.

Tabla 1. Cantidad o intensidad relativa (%) de las bandas significativamente diferentes del perfil proteico del plasma seminal en conejo entre línea y estación.

Tamaño Banda (kDa)	Línea		E E	Estación					E E
	A	R		Primavera	Verano	Otoño	Invierno		
236	3,54 ^a	3,56 ^b	±0,25	2,49	2,38	3,11	2,23	±0,36	
228	0,82 ^a	0,34 ^b	±0,07	0,47	0,59	0,64	0,62	±0,10	
217	0,48 ^a	0,14 ^b	±0,07	0,29	0,22	0,43	0,30	±0,10	
188	0,91 ^a	0,39 ^b	±0,09	0,46	0,57	0,78	0,79	±0,10	
169	0,59 ^a	0,87 ^b	±0,02	0,63 ^a	0,62 ^a	0,63 ^a	1,02 ^b	±0,03	
124	0,91 ^a	0,46 ^b	±0,09	0,52	0,66	0,81	0,73	±0,13	
29	13,83 ^a	18,08 ^b	±0,70	16,65	15,75	14,87	16,56	±0,99	
16	0,33 ^a	0,12 ^b	±0,02	0,24	0,26	0,21	0,19	±0,03	

E E: error estándar; ^{a,b}: valores con distinto superíndice en la misma fila y factor (línea o estación) difieren significativamente al 95% (P<0,05).

SEASONAL VARIATIONS IN SEMINAL PLASMA PROTEIN PROFILE OF TWO RABBIT LINES

ABSTRACT: In rabbits, several authors have studied the protein composition of seminal plasma of lines A and R and the results suggested the existence of seasonal variations in the protein composition of seminal plasma in this species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of season on seminal plasma protein profile of rabbit lines A and R. Results showed that eight protein bands were significantly different between genetic lines and among these, only one band was significantly different between seasons. In the remaining protein bands no significant differences were found. These results demonstrate the existence of differences in the relative amount of certain bands of seminal plasma protein profile between A and R line along the year. The differential presence of these eight proteins could explain the differences observed in fertility between these two lines in earlier studies. From this study, it can be concluded that in rabbit, genetic male line affects the protein composition of seminal plasma in a greater extent than the season. However, more studies are needed to understand how proteins regulate seminal plasma and sperm function to identify each protein with its particular effect.

Keywords: protein profile, season, seminal plasma, rabbit.

BAJO CONDICIONES *IN VITRO*, LA ADHESIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES A LAS CÉLULAS DEL OVIDUCTO SE VE FACILITADA SI NO TIENEN EXTERIORIZADA LA FOSFATIDILSERINA

López-Úbeda R., Diego R. y Matás C.

Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus Mare Nostrum. 30100 Murcia. cmatas@um.es

INTRODUCCIÓN

In vivo, la adhesión de los espermatozoides a las células del oviducto juega un importante papel en la selección espermática y en la regulación de la capacitación, impidiendo que los espermatozoides de menor calidad alcancen los ovocitos (Holt y Fazeli, 2010). Estudios *in vitro* han demostrado que el co-cultivo de espermatozoides con células oviductales prolonga su viabilidad y motilidad, estabiliza el acrosoma (Kervancioglu et al., 1994; Morales et al., 1996) y mantiene su capacidad fecundante (Pollard et al., 1991). Además, los espermatozoides capacitados ven reducida su capacidad para unirse a las células epiteliales (Luño et al., 2013).

Diferentes eventos acompañan al proceso de capacitación espermática en mamíferos, entre los que destacan los cambios en la concentración intracelular de iones, la concentración de calcio libre intracelular, la fosforilación de residuos de tirosina o la modificación de la fluidez de la membrana plasmática, lo que lleva asociado un aumento en los niveles de translocación de fosfatidilserina (TPS) (de Lamirande et al, 1993; Visconti et al, 1995; Gadella y Harrison, 2002; Matas et al., 2011). La TPS tradicionalmente se ha considerado como un marcador de apoptosis (Casao et al., 2010), aunque actualmente existe cierta controversia a cerca de si esta modificación es consecuencia del proceso de capacitación (Barroso et al., 2000; Duru et al., 2001), de apoptosis (Aitken and Baker, 2013) o de ambos (Aitken, 2011).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las posibles diferencias en los niveles de translocación de fosfatidilserina de la membrana espermática de espermatozoides porcinos después del co-cultivo con células epiteliales del oviducto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y cultivo de células epiteliales de oviducto: los oviductos se obtuvieron a partir de aparatos reproductores de cerdas procedentes de matadero. Fueron transportados al laboratorio en un recipiente atemperado a 37°C. En el laboratorio se lavaron en solución de cetrámid (Cetab) y posteriormente en solución salina fisiológica atemperada. Sobre una placa de Petri, en condiciones estériles, se procedió a la disección del oviducto separándolo de los tejidos adyacentes, así como del ovario. La obtención de las células epiteliales del oviducto se realizó por compresión del mismo, desde la región del istmo hasta la ampolla. El contenido se recogió sobre una placa de Petri, las células se disgregaron con medio TCM-199 equilibrado. Tras varios lavados, las células se resuspendieron en medio TCM-199 fresco y se sembraron en placas de Petri a 38°C con 5% CO₂ y atmósfera saturada. Transcurridos 3 días desde la siembra, se retiró el medio con las células no adheridas y se reemplazó por medio TCM-199 fresco. El proceso se repitió cada 2 días hasta la total confluencia de las células en una monocapa, aproximadamente a los 7 días. Con cada cambio de medio se comprobó la ausencia de contaminación y el crecimiento celular.

Procesado espermático: los espermatozoides fueron seleccionados a través de un gradiente discontinuo de Percoll® (Pharmacia, Uppsala, Sweden), mediante una columna de doble banda (45% Percoll® sobre 90% Percoll®) sobre la que se depositaron 0.5 ml de eyaculado. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 700g durante 30 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en medio TALP previamente equilibrado, tras lo cual se centrifugó nuevamente a 700g durante 10 minutos y el pellet final que contenía los espermatozoides lavados (L) se resuspendió en medio TALP ajustando la concentración a 1x10⁶ células/ml.

Incubación de los espermatozoides lavados (1x10⁶ spz/ml) sobre las células oviductales: se realizó en medio TALP durante 30 minutos a 38,5°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad. Transcurrido este tiempo las placas se lavaron bien y se recuperaron los espermatozoides. La incubación con células oviductales dio lugar a dos poblaciones

espermáticas: espermatozoides unidos a las células oviductales (U) y espermatozoides no unidos (NU). De forma paralela incubamos en placas sin células oviductales espermatozoides lavados (L30).

Evaluación de la translocación de fosfatidilserina en la membrana espermática: se llevó a cabo utilizando Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit (Sigma, Madrid, Spain). Para ello, 1 µL de Annexin V-Cy3™ (para determinación de la TPS), 5 µL de CFDA (para determinación de la viabilidad) y 450 µL de tampón fueron mezclados junto 50 µL de muestra espermática. Tras 10 minutos de incubación en oscuridad, las muestras se fijaron con formaldehído al 10%. Finalmente se evaluaron mediante un microscopio de epifluorescencia. Los espermatozoides con TPS presentaban fluorescencia roja (Ann+) y los espermatozoides viables fluorescencia verde (CFDA+).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la tabla 1. Los niveles de TPS fueron significativamente diferentes para los grupos experimentales. Los espermatozoides lavados (L) mostraron un bajo nivel de translocación (28%), lo cual era de esperar, ya que mediante el procesado espermático se inicia el proceso de capacitación y con él, la desestabilización de la membrana y la translocación de PS (Vermes et al., 1995; Aitken y Krausz, 2002). Este nivel de translocación aumentó (43%) tras 30 minutos de incubación sin células oviductales como consecuencia del aumento de capacitación espermática (Luño et al., 2013). Los espermatozoides no unidos a las células oviductales (NU) presentaron una elevada translocación de fosfatidilserina (94.00%) mientras que los espermatozoides unidos (U) mostraron niveles de translocación significativamente menores que el resto de grupos, incluso menores que los de los espermatozoides lavados (L). Esto podría ser debido a que las células oviductales son capaces de seleccionar aquellos espermatozoides con menor TPS y, por ello, con un menor grado de capacitación ya que como observaron Luño et al (2013) los espermatozoides unidos al oviducto no presentaban fosforilación de la tirosina en la zona acrosomal (Luño et al., 2013). Esto podría explicar la diferencias observadas entre los espermatozoides unidos (U) y no unidos (NU) a las células. En todos los grupos experimentales los espermatozoides viables superaban el 44%, destacando el 94,78% que encontramos en los espermatozoides unidos (B):

Conclusión: bajo condiciones *in vitro*, los espermatozoides con bajo grado de TPS son los que, de forma mayoritaria, son seleccionados y unidos por las células oviductales

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken RJ & Krausz C. 2002. *Reproduction* 122:497–506
- Aitken, 2011. *Biol Reprod* 85: 9-12
- Aitken and Baker, 2013. *Int J Dev Biol* 57:265-272
- Barroso et al., 2000. *Hum Reprod* 15: 1338-1344
- Casao et al., 2010. *J Pineal Res* 48:39-46
- Duru et al., 2001. *Fertil Steril* 75: 263-268
- Gadella & Harrison, 2002. *Biol Reprod* 67: 340-350
- Holt WV, & Fazeli A. 2010. *Mol Reprod Dev.* 77: 934-943
- Kervancioglu et al., 1994. *Fertil Steril.* 61, 1100–1108
- de Lamirande et al, 1993. *Free Radic Biol Med* 14:157-166
- Luño et al., 2013. *Reproduction* 146: 315-324
- Matas et al., 2011. *Anim Reprod Sci* 127: 62-72
- Morales et al., 1996. *Hum Reprod.* 11, 1504–1509
- Pollard et al., 1991. *Biol reprod* 44: 102-107
- Vermes et al., 1995. *J Immunol Methods* 184: 39–51
- Visconti et al, 1995. *Development* 121: 1129-1137.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por MINECO (AGL2012-40180-C03-01).

Tabla 1. Resultados de Anexina V-CY3 obtenidos a partir de espermatozoides incubados en células oviductales: L (espermatozoides lavados, no incubados), L30 (espermatozoides lavados incubados 30 minutos en medio TALP sin células oviductales), NU (espermatozoides no unidos a las células oviductales tras 30 minutos de incubación), U (espermatozoides unidos a las células oviductales tras 30 minutos de incubación).

TRATAMIENTO	N	ANEXINA POSITIVOS (Ann+)	VIABLES (CFDA+)
L	1000	28,00 ± 1,40 ^a	68,67 ± 4,73 ^a
L30	1200	43,00 ± 1,40 ^b	63,07 ± 4,65 ^a
NU	1600	94,00 ± 0,60 ^c	44,08 ± 4,76 ^b
U	1000	21,00 ± 1,30 ^d	94,78 ± 3,70 ^c

a,b,c,d: Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).
N: número de espermatozoides evaluados.

UNDER IN VITRO CONDITION, SPERMATOZOA WITHOUT EXTERNALIZATION OF PHOSPHATIDYLSERINE ARE MOST ABLE TO BIND OVIDUCTAL EPITHELIAL CELLS

ABSTRACT: Phosphatidylserine translocation is a feature of apoptosis and a marker commonly used to study this phenomenon (Casao et al., 2010). Therefore, differences in the levels of PS translocation between the population of sperm bound and not bound to the oviductal epithelial cells (OEC) could be expected. The aim of this study was to characterize possible differences in the phosphatidylserine translocation of boar sperm membrane after the co-culture with OEC. Sperm cells treated by discontinuous gradient of isotonic Percoll (washed sperm; L) were added to the oviductal epithelial cells (OEC) and incubated for 30 minutes. As control, washed sperm was incubated on Petri dish without OEC (L30). Four different sperm samples were analyzed by Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) to differentiate between sperm cells with (Ann+)/without (Ann-) inverted PS. Washed sperm (L) showed low levels of PS translocation (28.00%), these values increased (43.00%) after incubation in capacitation condition (TALP medium) without OEC (L30). Incubation with OEC resulted in two distinct groups: unbound sperm (NU) with high levels of PS inversion (94.00%) and bound sperm (U) that showed the lower levels (21.00%). These results showed that oviductal epithelial cells are able to select sperm cells without phosphatidylserine translocation and bind them.

Keywords: oviductal epithelial cells, sperm, phosphatidylserine translocation, porcine.

EFFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE LA CALIDAD IN VITRO Y LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN FRESCO Y CRIOCONSERVADO DE GALLOS DE RAZA GALLINA VALENCIANA DE CHULLILLA

Fajardo¹, A., Tomás¹, C., Blanch¹, E., Gómez¹, E.A., Casares-Crespo^{1,2}, L., Sansano², S., Giménez², I., y Mocé¹, E.

¹CITA-IVIA- Apdo.187. 12400-Segorbe (Castellón). España. ²Rara Avis Biotec S.L. Valencia. España. moce_eva@gva.es

INTRODUCCIÓN

El glicerol (G) se usa normalmente a una concentración del 11% (v:v) en los diluyentes de congelación de semen de gallos (Long et al., 2010; Mocé et al., 2010; Purdy et al., 2009), y con él se consiguen buenos resultados cuando se utiliza semen de líneas de gallos subfértiles (Blesbois, 2007). Sin embargo, es anticonceptivo en gallinas cuando excede el 1% (v:v) de concentración (Lake et al., 1980), por lo que ha de ser eliminado (mediante dilución y posterior centrifugación) antes de la inseminación artificial (IA). La dilución debe realizarse de forma lenta, existiendo protocolos que tienen desde 6 pasos y tasa de dilución (TD) 1:4 (v:v; Mocé et al., 2010) hasta 35 pasos y TD 1:2,6 (v:v; Purdy et al., 2009).

Ante la baja fertilidad obtenida en experimentos previos con semen congelado de la raza de gallina valenciana de Chullilla (G 11% y TD 1:4 en 6 pasos; Tomás et al., 2013) nos planteamos si las bajas fertilidades eran debidas a una baja dilución del G o al proceso de congelación y descongelación. Así pues, en el presente trabajo estudiamos el efecto de la TD del G (1:2,6 y 1:22; v:v) sobre la calidad in vitro y la fertilidad in vivo del semen fresco y descongelado de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chullilla, utilizando el protocolo de dilución de 35 pasos (Purdy et al., 2009) para minimizar los choques osmóticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España), excepto el yoduro de propidio (PI) y el SYBR-14, que fueron adquiridos en Invitrogen (Barcelona, España). Para la valoración del semen fresco inicial se utilizó el diluyente BPSE-I y el Lake pre-congelación (LPC) para la congelación. Para la dilución del semen post-descongelación se utilizó el diluyente Lake centri (LC). El diluyente Lake 7.1 (L7.1) se utilizó para resuspender los espermatozoides después de eliminar el G y para valorar las muestras descongeladas o frescas (diluidas con G). La composición de los diluyentes está detallada en Blanch et al. (2014). La motilidad en las muestras frescas sin G, se valoró con BPSE suplementado con BSA (0,3 %) y para el análisis por citometría de flujo (EPICS XL, Coulter Corporation Inc., Miami, FL, EE.UU.) se utilizó el BPSE. Se utilizó el medio L7.1 suplementado con G (11 %; Purdy et al., 2009) y BSA para evaluar la motilidad de las muestras descongeladas antes de eliminar el G, y para la citometría se usó L7.1-G (durante la incubación con las tinciones) y L7.1 para la dilución final y el análisis de las muestras. En las muestras descongeladas y frescas tras eliminar el G se utilizó L7.1 suplementado con BSA para evaluar la motilidad.

Los gallos (n=26) pertenecían a la raza Gallina Valenciana de Chullilla. Para las inseminaciones se utilizaron gallinas ponedoras (n = 27) de la línea Lohmann Brown Classic. El semen fue extraído, almacenado y la calidad de las muestras fue evaluada según protocolos descritos en Blanch et al. (2014). Los eyaculados válidos se mezclaron para constituir un *pool* y cada *pool* fue conservado en fresco (n=2) o congelado (n=3) con 11% (v:v) G, siguiendo el protocolo descrito por Blesbois et al., (2008), detallado en Blanch et al., (2014). La descongelación se realizó en baño de agua a 5 °C, en 3 min y la evaluación de la motilidad y de la viabilidad se realizaron según los protocolos descritos en Blanch et al., (2014). Fueron tomados los siguientes datos: espermatozoides móviles totales (TM;%), móviles progresivos (TMP;%), vivos (espermatozoides con membrana plasmática intacta; %) y concentración (espermatozoides/mL).

Para eliminar el G del semen fresco y descongelado se realizaron diluciones seriadas con LC según el protocolo de Purdy et al., (2009), y para alcanzar la TD 1:22 se hizo una ampliación del protocolo que consistió en 5 diluciones de 50µL, 10 diluciones de 100µL y 18 diluciones de 18µL por pajueta de 0,25 mL. El tiempo transcurrido entre una dilución y la siguiente fue de 2 minutos. Después de la última dilución el contenido total se dividió en

tubos, que fueron centrifugados a 300g durante 25 min a 5 °C. El sobrenadante fue eliminado, los pellets de cada tratamiento fueron mezclados y la concentración fue ajustada a $1,2 \times 10^9$ espermatozoides/mL con L7.1. Cada gallina fue inseminada por vía intravaginal con una pipeta automática, recibiendo dos IA (180×10^6 espermatozoides/IA en 150 μ L) separadas 48 h (d0 y d2). Se inseminaron entre 5-8 gallinas en cada tratamiento (5 gallinas en el semen fresco, TD 1:22; 7 gallinas en el semen fresco TD 1:2,6 y semen congelado, TD 1:22; y 8 gallinas en el semen congelado, TD 1:2,6), y las IA se realizaron en 15 min desde la eliminación del sobrenadante. Los huevos se recogieron desde el día 2 hasta el día 5, fueron incubados y a los 7 días se evaluaron en el ovoscopio. Se recogieron un total de 105 huevos (28 de semen fresco, TD 1:2,6; 18 de semen fresco, TD 1:22; 31 de semen congelado TD 1:2,6; y 28 de semen congelado TD 1:22).

Los datos se analizaron con el programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Los parámetros de calidad seminal se analizaron con un modelo mixto en el que se incluyó el *pool* como efecto aleatorio y el tipo de semen (TS), la TD y su interacción como efectos fijos. El ajuste Tukey-Kramer se utilizó para evaluar las diferencias entre medias ($P < 0,05$). Los datos binomiales de fertilidad se analizaron con un modelo de regresión logística incluyendo el día de recogida de huevos, TS, TD y la interacción TSxTD como efectos fijos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del semen fresco fue elevada (79% TM, 67% TMP, 93,8% vivos, $1,96 \times 10^9$ espermatozoides/mL). La calidad del semen congelado fue elevada antes de eliminar el glicerol (62,6% TM, 50,6% TMP 74,8% vivos), siendo los resultados similares a los obtenidos en estudios previos (entre 48 y 71% TM, 32% TMP y 78% vivos; Mocé et al., 2014; Blanch et al., 2012; Purdy et al., 2009)

Tanto la TD como el TS tuvieron un efecto significativo (Tabla 1) para los TM (%), presentando la TD más baja (1:2,6) mejores motilidades que la tasa de TD más alta (1:22) y presentando el semen fresco más TM que el congelado. La interacción no fue significativa, ya que ambos tipos de semen presentaron más TM al usar la TD 1:2,6. En el caso de los TMP (%), solo la TD tuvo un efecto significativo (Tabla1), presentando nuevamente la TD 1:2,6 mejores resultados que la TD 1:22. Estos resultados corroboran los de otros autores que observaron una alteración en la calidad del semen fresco de gallos al usar diluciones superiores a 1:10 (v:v; Parker y McDaniel, 2014).

El semen fresco presentó mayor capacidad fecundante que el congelado (Tabla 1), lo que corrobora resultados previos (Wishart, 1985). Se ha estimado que la capacidad fecundante de los espermatozoides congelados se reduce al 1,6% de la que presenta el semen fresco (Wishart, 1985), por lo que esta diferencia de fertilidad al usar dosis de IA similares para ambos tipos de semen es lógica. No obstante, ni la TD ni el día de recogida de huevos afectaron a la fertilidad. Por otra parte, se observó una interacción entre TS y TD. Así, el semen fresco presentó mayor fertilidad (Tabla 1) con la TD 1:22 que con la TD 1:2,6, mientras que el semen congelado presentó una fertilidad similar (y baja) con ambas TD. Es probable que estos resultados observados en las dosis frescas sean debidos a la cantidad de G residual en la dosis de IA, ya que ésta era todavía anticonceptiva en la TD 1:2,6 (1,4% versus 0,2% para la TD 1:22). En el caso del semen congelado, el G residual en las dosis procesadas con la TD 1:2,6 (0,98%) se encontraba al límite de la anticoncepción, pero en este caso la dilución 1:22 no mejoró la fertilidad. Aunque el G tiene efectos perniciosos sobre los espermatozoides (Hammerstedt y Graham, 1992), los efectos dañinos que el propio proceso de congelación-descongelación provoca sobre los espermatozoides podrían explicar la diferente respuesta que presentan el semen fresco y descongelado al mismo protocolo de dilución. Además, el bajo porcentaje de espermatozoides móviles que presentan las dosis de IA de semen descongelado podría agravar el problema de subfertilidad y quizás se podría compensar al incrementar el número de espermatozoides en la dosis de IA.

En conclusión, la calidad de la dosis de inseminación es mayor cuanto menor es la TD, aunque esta mayor calidad no se refleja en una mayor fertilidad ni en el semen fresco ni en el descongelado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Blanch, E., et al., 2014. Theriogenology 81: 1174-1180. •Blanch, E., et al., 2012. Reprod. Domest. Anim. 47: 121. • Blesbois, E., et al., 2008. Theriogenology 69: 252-261. • Blesbois, E., 2007. Worlds Poult. Sci. J.63: 213-222. •Hammerstedt, R.H. et al.,1992. Cryobiology 29: 26-38. • Lake, P.E., et al., 1980. Cryo-Letters 1: 299-304. •Long, J.A., et al., 2010. Poult. Sci. 89: 966-973. •Mocé E., et al., 2014. Reprod. Domest. Anim. 49: 98. • Mocé, E., et al., 2010. Anim. Reprod. Sci 122: 359-366. •Parker, H.M., et al., 2004 Int. J. Poult. Sci. 3: 588-592. • Purdy, P.H., et al., 2009. Poult. Sci. 88: 2184-2191. •Tomás, C., et al., 2013 XV Jornadas sobre producción animal. 1: 425-427. •Wishart. G.J., 1985. Br. Poult. Sci. 26: 375-380.

Agradecimientos: financiado por INIA RZ2008-00027-00-00, MICINN (E. Mocé, ref. RYC-2010-06162) co-financiados con fondos FEDER, y por becas de formación y especialización del IVIA (A. Fajardo, L. Casares-Crespo).

Tabla 1. Calidad *in vitro* (I.s.m± e.e.) y fertilidad *in vivo* de pools de semen fresco (n=2) y congelado (n=3) de gallos de la raza gallina valenciana de Chulilla y tasas de dilución (TD) 1:2,6 y 1:22 (v:v) para eliminar el glicerol.

Efecto fijo			Móviles totales (%)	Móviles progresivos (%)	Fertilidad (%)* [n]
TD		1:2,6	39,8 ^B ±1,9	29,3 ^B ±2,0	11,3 ±4,1 [59]
		1:22	20,5 ^A ±1,9	15,5 ^A ±2,0	22,5 ±9,9 [46]
Tipo de semen (TS)	Fresco		36,0 ^B ±1,9	27,5 ±2,0	38,3 ^B ±8,7 [46]
	Congelado		24,3 ^A ±1,9	17,3 ±2,0	5,6 ^A ±3,2 [59]
Interacción (TS x TD)	Fresco	1:2,6	47,5 ±2,7	36,0 ±3,0	13,9 ^y ±6,5 [28]
	Fresco	1:22	24,5 ±2,7	19,0 ±3,0	70,4 ^z ±10,3 [18]
	Congelado	1:2,6	32,0 ±2,7	22,5 ±3,0	9,1 ^y ±5,1 [31]
	Congelado	1:22	16,5 ±2,7	12,0 ±3,0	3,4 ^y ±3,4 [28]

I.s.m.: medias por mínimos cuadrados; e.e.: error estándar; [n]: número de huevos; ^{A,B}: indican diferencias entre tasas de dilución (P<0,05); ^{α,β}: indican diferencias entre tipos de semen (P<0,05); ^{y,z}: indican diferencias entre grupos (TS x TD; P<0,05). *Los resultados se presentan como predicciones en la escala de los datos ± error estándar asociado.

EFFECT OF DILUTION RATE ON THE IN VITRO QUALITY AND THE FERTILIZING ABILITY OF FRESH AND CRYOPRESERVED SPERM FROM ROOSTERS BELONGING TO THE "GALLINA VALENCIANA DE CHULILLA" BREED

ABSTRACT: The glycerol (G; 11%; v:v) is a cryoprotectant which offers good results for the cryopreservation of local breed rooster sperm. In this study the *in vitro* quality and fertilizing ability of fresh and cryopreserved sperm processed with two different dilution rates (DR; 1:2,6 and 1:22) for the G removal were compared. The DR 1:2,6 exhibited higher *in vitro* quality than DR 1:22 and fresh sperm presented higher quality and fertility than cryopreserved sperm. In addition, an interaction between the type of semen and the DR was observed in the fertility rate, the fresh sperm exhibiting higher fertilizing ability with the high DR than with the low DR, while cryopreserved sperm presented similar fertilizing ability for both DR. In conclusion, the quality of the doses is higher if a low DR (1:2,6) is used but this quality at low DR does not translate into higher fertility.

Keywords: glycerol, chicken, fowl, semen.

EVALUACIÓN DEL COLOIDE ANDROCOLL™ PARA SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS DE CIERVO

Crespo-Félez, I., Pardal, S., Mata-Campuzano, M., Castañeda, A., Morrell, J. y Martínez-Pastor¹, F.

¹INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España. felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas reproductivas para especies domésticas y silvestres ha supuesto un gran avance en producción y conservación animal. La criopreservación seminal es una de las técnicas más valiosas, ya que permite conservar indefinidamente los espermatozoides. Sin embargo, la criopreservación es un proceso muy estresante, que frecuentemente disminuye la fertilidad de las dosis (Johannisson et al., 2009). Una estrategia consiste en aplicar gradientes de selección espermática (Watson, 2000), tanto antes (Heutelbeck et al., 2015) como después (Dorado et al., 2013) de criopreservar. La centrifugación de gradiente en un sola capa (SLC, single layer centrifugation) es una técnica diseñada para seleccionar, mediante un coloide, espermatozoides con buena movilidad, integridad de la membrana, morfología normal y cromatina intacta (Morrell et al., 2009). Este coloide se ha adaptado a distintas especies, siendo el Androcoll-O™ el diseñado para ovino. Mata-Campuzano et al. (2013) utilizaron este coloide con espermatozoides de ciervo rojo (*Cervus elaphus hispanicus*), seleccionando una subpoblación con unos parámetros fisiológicos de calidad mejorados. El fin del presente estudio es comparar varios protocolos con Androcoll-O™ en cuanto a su eficacia para la selección de espermatozoides descongelados de ciervo rojo, así como la caracterización de los espermatozoides seleccionados y retenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos generales fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), y los fluorocromos fueron comprados a Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Utilizamos dosis seminales de carneros y muestras epididimarias de ciervo, congeladas en medio Tris-citrato-fructosa (20% yema de huevo y 8% glicerol), a 10^5 espermatozoides/ml. Se realizaron 4 sesiones experimentales. En cada una se descongelaron 6 dosis (37 °C, 30 s), que se mezclaron para conseguir un pool. Se prepararon cuatro tubos con 1 ml de Androcoll-O-S (*small*, optimizado para volúmenes pequeños de muestra), y se preparó un diseño factorial en el que se cruzaron dos volúmenes de muestra (150 μ l y 300 μ l de pool) y dos regímenes de centrifugación —RCF— (300 \times g y 600 \times g). Los tubos se centrifugaron durante 20 min. Se preparó un tubo control con 50 μ l del pool y 500 μ l de TALP-Hepes, que no se centrifugó. Tras la centrifugación se tomó una alícuota de la interfase y se eliminó todo el sobrenadante. Tanto la interfase como el pellet se diluyeron con TALP-Hepes y se analizaron. Se determinó la concentración (hemocitómetro Bürker) tanto del pool como del pellet, estimándose los espermatozoides iniciales como los recuperados y calculándose una tasa de recuperación como recuperados/iniciales \times 100. Los espermatozoides de la muestra control, de la interfase y el pellet de cada tratamiento fueron analizados mediante citometría de flujo tras teñirlos con las sondas YO-PRO-1 (100 nM), yoduro de propidio (3 μ M), Mitotracker deep red (100 nM) y Hoechst 33342 (5 μ M) durante 15 min a 37 °C. El análisis se realizó con un citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), provisto de tres láseres de diodo (405 nm —violeta—, 488 nm —azul— y 635 nm —rojo—). La fluorescencia fue recogida por fotodetectores provistos de filtros 450/50 (láser violeta, fluorescencia azul: Hoechst 33342), 530/40 (láser azul, fluorescencia verde: YOPRO1), 613/20 (láser azul, fluorescencia roja: yoduro de propidio) y 665/20 (láser rojo, fluorescencia roja: Mitotracker deep red). Los datos se analizaron con el paquete estadístico R (<http://www.r-project.org>), utilizando modelos lineales de efectos mixtos (efectos fijos: volumen de muestra y RFC; efectos aleatorios: replicado). Los resultados se indican como media \pm desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El coloide Androcoll permite una rápida preparación y recuperación de los espermatozoides, ya que consta de una sola fase. Los espermatozoides recuperados en el pellet representan una población de células de mayor densidad, que es capaz de atravesar el coloide. Coincidiendo con estudios previos (Dorado et al., 2013; Morrell et al., 2009), la fracción

seleccionada mostró un mayor porcentaje de espermatozoides viables (YO-PRO-1⁺; Figura 1a) y con mitocondrias activas (Mitotracker⁺; Figura 1b), así como una menor proporción de espermatozoides "apoptóticos" (Figura 1c). Este último parámetro se estimó como la proporción de espermatozoides YO-PRO-1⁺ (permeabilidad de membrana alterada) dentro de la población de viables (ratio de apoptosis). Las diferencias entre los distintos protocolos respecto a la calidad espermática fueron pequeñas, aunque detectamos una interacción ($P < 0,05$) entre la fracción aislada (pellet vs. interfase) y las RCF (300×g y 600×g) para viabilidad y actividad mitocondrial. Mientras que no hubo diferencias destacadas para la interfase, el pellet mostró unos valores algo mayores para 300×g en actividad mitocondrial ($89,0\% \pm 3,3$ vs. $83,9\% \pm 6,5$; $P = 0,008$). En cuanto a recuperación (espermatozoides en el pellet / espermatozoides iniciales), obtuvimos como media $34,5\% \pm 13,3$, con un número absoluto de espermatozoides recuperados de $4,3 \pm 1,7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ para 300×g y $7,1 \pm 2,6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ para 600×g (concentración media del pool: $76,1 \pm 9,1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). Si bien no hubo diferencias claras entre protocolos, encontramos una interacción significativa ($P = 0,028$) entre las RCF y el volumen de muestra utilizado (Figura 1d). Mientras que a 300×g los resultados fueron similares, aumentando a 600×g paradójicamente resultó en una ligera disminución en la recuperación cuando utilizamos 300 μL de muestra ($P = 0,037$). Posiblemente, el aumento de RCF cause una formación rápida de la capa de interfase, impidiendo que los espermatozoides viables pasen eficientemente al coloide si la cantidad de células es excesiva.

No existen muchos estudios en los que se utilice Androcoll con semen descongelado. Dorado et al. (2013) obtuvieron una recuperación mayor que la nuestra en semen descongelado de perro (63,3% vs. 34,5% de media), usando Androcoll-C (para perro). No obstante, la viabilidad obtenida en la fracción seleccionada fue solo del 54% (87,0% en nuestro caso). En rumiantes, Jiménez-Rabadán et al. (2012) utilizaron Androcoll-B (para toro) con semen descongelado de cabra, obteniendo una recuperación media menor que la nuestra ($13,6\% \pm 2,6$). Estos autores obtuvieron parámetros de viabilidad y actividad mitocondrial mejorados (antes de SLC: ~30% y ~0%; después: ~80% y ~55%). Las diferencias con estos trabajos podrían deberse no solo a las especies, protocolos de congelación y tipos de Androcoll, sino también al tipo de muestras utilizadas en este trabajo, obtenidas de la cola del epidídimo (posiblemente más resistentes a la criopreservación y al estrés que el semen eyaculado).

En conclusión, el Androcoll-O-S nos ha permitido, de una forma muy sencilla, recuperar una población de alta calidad a partir de dosis descongeladas de ciervo rojo. Este trabajo confirma los resultados obtenidos anteriormente (Mata-Campuzano et al., 2013). Además, hemos encontrado una dependencia entre las RCF y la cantidad de espermatozoides aplicados, indicando que estos parámetros deben ajustarse conjuntamente en los distintos protocolos. Considerando los resultados de este trabajo y con una concentración espermática similar, recomendaríamos utilizar una columna por dosis de semen (~150 μL), con 600×g como RCF que permite mayor recuperación con una buena calidad en el pellet.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dorado, J., Gálvez, J. M., Morrell, J. M., Alcaráz, L. & Hidalgo, M. 2013. *Theriogenology* 80: 955-62.
- Heutelbeck, A., Oldenhof, H., Rohn, K., Martinsson, G., Morrell, J. & Sieme, H. 2015. *Reprod. Domest. Anim.* 50:76-83.
- Jiménez-Rabadán, P., Morrell, J. M., Johannisson, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Álvaro-García, P. J. et al., 2012. *Anim. Reprod. Sci.* 136:47-54.
- Johannisson, A., Morrell, J.M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A.M. & Rodríguez-Martínez, H. 2009. *Anim. Reprod.* 116:119-28
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Campillo, I., Palacios-Aguado, A., Fuentes, C., Redondo-Blanco, S., Alonso-Molero, J. & Martínez-Pastor, F. 2013. XV Jornadas sobre Producción Animal AIDA.
- Morrell, J.M., Dalin, A.M. & Rodríguez-Martínez, H. 2009. *Equine Vet. J.* 41: 53-58.
- Watson P. F. 2000. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:481-492

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Sueca de Ciencias Agrarias (SLU) por haber financiado en parte este estudio.

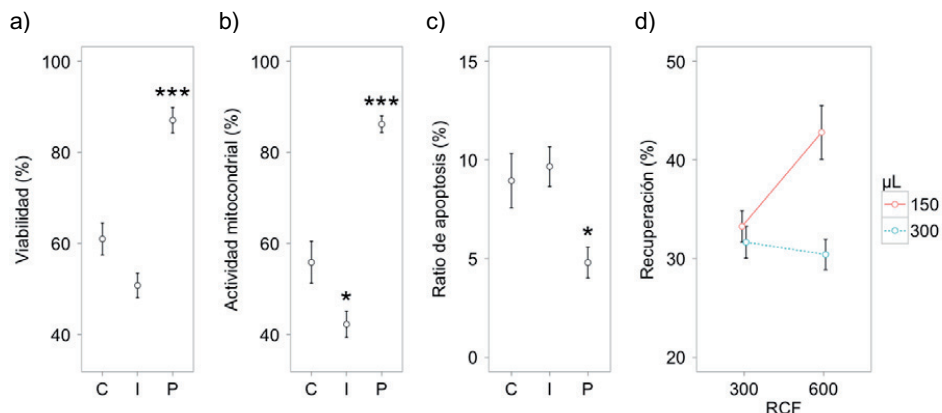


Figura 1. Las subfiguras a-c muestran las diferencias de calidad entre la muestra sin seleccionar (Control, C), los espermatozoides retenidos en la interfase (I) y los espermatozoides seleccionados (pellet, P). Los asteriscos indican diferencias con el Control (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). La recuperación de espermatozoides en el pellet (d) fue afectada por una interacción entre el volumen de muestra y las RCF. Se muestran medias \pm SEM.

EVALUATION OF THE ANDROCOLL™ COLLOID FOR THAWED SPERMATOZOA SELECTION IN RED DEER

ABSTRACT: Selection of the optimal spermatozoa population is a necessary step in reproductive techniques, and it increases the quality and resilience of spermatozoa. Androcoll is a single-layer selection colloid that has been adapted to many species. We tested Androcoll-O-S (for sheep and small volumes) for selecting cryopreserved spermatozoa from red deer. Samples were collected from the cauda epididymis, frozen (20% egg yolk, 8% glycerol) and selected post-thawing. We tested two sample volumes, 150 and 300 µL, and two RCF, 300 and 600×g (20 min), in a 1-mL Androcoll volume. Analysis (flow cytometry, YO-PRO-1/propidium iodide/Mitotracker deep red) of selected cells (pellet) resulted in improved viability (87.3% \pm 10.9), mitochondrial activity (86.5% \pm 5.7) and apoptotic ratio (4.8% \pm 2.2) than the unselected control (61.4% \pm 10.8, 56.1% \pm 8.2, 8.9% \pm 2.7), with 300×g achieving slightly higher results for mitochondrial activity. Low quality spermatozoa (48.4% \pm 9, 39.4% \pm 10.2, 9.9% \pm 5.1) were retained in the interphase. Recovery (selected/unselected cells, overall 29.1% \pm 10.9) showed an interaction between volume and RCF, with increasing RCF not improving recovery when using 300 µL at 600×g (26.2% \pm 10.1 vs. 34.3% \pm 13.5 for 150 µL), maybe because a higher number of cells at these RCF could impair that high-quality cells enter the colloid. Androcoll-O-S is convenient and effective for selecting high-quality spermatozoa from thawed red deer.

Keywords: red deer, Androcoll, recovery, sperm selection.

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN CONEJO

Casares-Crespo, L., Talaván, A.M. y Viudes-de-Castro, M.P.
CITA-IVIA. Polígono de la Esperanza, nº 100. 12400. Segorbe (Castellón).
viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

El conejo es una especie de ovulación inducida, por lo que en inseminación artificial, además de aplicar la dosis seminal, hay que inducir la ovulación con un análogo sintético de la GnRH. La utilización de diluyentes que incorporen el análogo de la GnRH a su composición, además de simplificar enormemente la técnica de inseminación artificial, es considerada una práctica orientada al bienestar animal (Dal Bosco et al., 2011), ya que evita el dolor que conlleva la administración intramuscular de dicho compuesto. Sin embargo, la eficacia del análogo en el diluyente dependerá tanto de la absorción del compuesto por la mucosa vaginal como de la degradación del mismo por parte de las enzimas presentes en el plasma seminal (Vicente et al., 2011). Por ello, cuando el análogo de GnRH se añade al diluyente de inseminación, la concentración requerida para alcanzar unos niveles de fertilidad similares a los obtenidos con la administración intramuscular es mucho más elevada (en torno a diez veces más). Se ha descrito la presencia de distintas aminopeptidasas en el plasma seminal de mamíferos (Vanha-Perrtula, 1988; Agrawal and Vanha-Perrtula, 1986; Ohkubo et al., 1994; Huang et al., 1997). En el caso del conejo se ha observado que el origen genético afecta a la concentración de aminopeptidasas presentes en el plasma seminal (Viudes de Castro y Mocé, 2013). Además, cuando el análogo de la GnRH es añadido al diluyente de inseminación, su biodisponibilidad depende de la concentración de aminopeptidasas presentes en el plasma seminal (Viudes de Castro et al., 2014). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición de la actividad aminopeptidasa del plasma seminal de conejo sobre los parámetros de calidad seminal (motilidad e integridad del acrosoma).

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo entre octubre y diciembre de 2014. Se utilizaron machos de aptitud maternal (Neozelandés blanco A) y de aptitud cárnica (línea sintética R) alojados en la granja experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe (CITA-IVIA, Castellón, España). Se obtuvieron muestras seminales usando una vagina artificial. De cada eyaculado se tomó una alícuota que fue diluida 1:5 con el diluyente TCG, descrito por Viudes de Castro et al. (1999) y se hizo una primera evaluación subjetiva de motilidad bajo microscopio a 400 aumentos. Aquellos eyaculados con valores superiores al 70% de motilidad se mezclaron y el resto se descartaron. Se utilizaron un total de 10 mezclas heterospermicas, 5 por línea. De cada mezcla se cogieron tres alícuotas. Una alícuota de 20 µl se diluyó 1:50 con una solución de glutaraldehído al 0,25% para calcular la concentración y la tasa de anormalidad morfológica, utilizando una cámara Thoma bajo microscopio a 400 aumentos en contraste de fases. Con las otras dos alícuotas se evaluó la motilidad mediante un sistema computerizado de análisis de imagen (CASA, ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España) y la integridad del acrosoma mediante citometría de flujo en un citómetro Epics XL-MCL (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España), utilizando los fluorocromos FITC-PNA y yoduro de propidio. En el experimento se utilizaron cinco diluyentes diferentes, TCG (control) y otros cuatro diluyentes experimentales que se prepararon añadiendo al TCG un inhibidor de proteasas diferente cada vez (bestatina 10 µM, EDTA 20 mM, EDTA 30mM y un cóctel comercial de inhibidores de proteasas diluido 1:100 según recomienda el fabricante, Sigma-Aldrich). Las mezclas espermáticas se dividieron en cinco partes iguales y se diluyeron con el diluyente correspondiente (dilución 1:5; v:v). Se dejaron a temperatura ambiente (20-25 °C) y protegidas de la luz durante dos horas. Tras ese tiempo, se tomó una alícuota para medir de nuevo la motilidad y la integridad del acrosoma y el resto fue utilizado para analizar la actividad aminopeptidasa, para lo cual las muestras fueron centrifugadas a 10110 g durante 10 minutos a 22 °C, el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar en las

mismas condiciones para eliminar espermatozoides residuales, y fue finalmente almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. La actividad aminopeptidasa se midió de acuerdo con lo descrito por Viudes-de-Castro et al. (2014). Este ensayo se basa en la fluorescencia de la β -naftilamida que es generada en la reacción de hidrólisis del sustrato, L-Ala- β -naftilamida, que es hidrolizado por la enzima. Brevemente, las muestras fueron incubadas con el sustrato durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, tras los cuales se detuvo la reacción con tampón acetato 0,1 M (pH 4,2). La β -naftilamida liberada como consecuencia de la actividad enzimática se cuantificó fluorimétricamente a 460 nm de emisión, con una excitación de 355 nm. Los valores de fluorescencia obtenidos con las muestras experimentales se transformaron en picomoles de β -naftilamida liberada mediante la extrapolación de sus valores en una recta de calibración previamente obtenida. Como la actividad enzimática de una muestra está referida a la cantidad de proteína que contiene la misma, se llevó a cabo la cuantificación de proteína total de las muestras seminales mediante el método del ácido bicinónico (BCA) utilizando BSA como patrón de proteínas (Smith et al., 1985). La actividad enzimática y concentración de proteína se midieron por triplicado. En el cálculo del porcentaje de inhibición de la actividad aminopeptidasa se utilizó como referencia la actividad del grupo control en cada caso.

El efecto del inhibidor y la línea del macho sobre la motilidad, la integridad del acrosoma y la actividad aminopeptidasa fue analizado mediante un análisis de varianza, utilizándose el paquete estadístico Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ya se había demostrado previamente la existencia de actividad aminopeptidasa en el plasma seminal del conejo (Viudes de Castro y Mocé, 2013; Viudes de Castro et al., 2014). En el presente trabajo, la línea genética del macho no tuvo efecto significativo sobre ninguna de las variables estudiadas. Los resultados del efecto de los distintos inhibidores de aminopeptidasas sobre la motilidad, integridad del acrosoma e inhibición de la actividad aminopeptidasa se muestran en la Tabla 1. No se observaron diferencias significativas en los resultados de calidad seminal entre los distintos diluyentes utilizados, siendo los valores de motilidad e integridad del acrosoma tras dos horas de incubación, similares en todos los grupos. En lo que se refiere a la actividad aminopeptidasa, ésta era inhibida con todos los diluyentes experimentales utilizados, observándose diferencias significativas entre ellos. Los diluyentes con EDTA en su composición, a las concentraciones probadas, inhibían significativamente menos la actividad aminopeptidasa que los otros diluyentes, situándose el porcentaje de inhibición por encima del 30%, mientras que con los diluyentes que contenían bestatina y el cóctel de inhibidores se obtuvieron valores de 63 y 65 % de inhibición de la actividad aminopeptidasa, respectivamente. En trabajos anteriores se ha observado que la actividad aminopeptidasa del plasma seminal afectaba a la biodisponibilidad de acetato de buserelina, cuando éste era añadido al diluyente de inseminación artificial (Viudes de Castro et al., 2014). Por ello, la utilización de inhibidores de aminopeptidasas en la composición de los diluyentes de inseminación artificial de conejo permitiría inactivar parte de las aminopeptidasas presentes en el plasma seminal, lo cual, posiblemente disminuiría la degradación que sufre el análogo de la GnRH cuando es utilizado en el diluyente de inseminación. En conclusión, la utilización de inhibidores de la actividad aminopeptidasa en los diluyentes de semen de conejo no afecta a la calidad seminal y reduce considerablemente la actividad alanina aminopeptidasa. Sin embargo, serían necesarios más trabajos para evaluar si existe un efecto de los inhibidores de aminopeptidasas sobre los resultados de fertilidad y prolificidad en la inseminación artificial cuando este tipo de sustancias son añadidas al diluyente, ya que en otras especies como el erizo de mar, la adición de bestatina al espermatozoide afectó negativamente al proceso de fertilización (Yasuhara et al., 1983).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal and Vanha-Perrtula, 1986. Clin. Chim. Acta 177: 179-95; • Dal Bosco et al., 2014. Anim. Reprod. Sci. 150: 44-49. • Huang et al., 1997. J. Biochem. 122: 779-787. • Ohkubo et al., 1994. J. Biochem. 116: 1182-1186. • Smith et al., 1985. Anal. Biochem. 150: 76-85. • Vanha-Perrtula, T. 1988. Int. J. Androl. 9: 453-52. • Vicente et al., 2011. Theriogenology 76: 1120-25. • Viudes de Castro et al., 1999. Ann. Zootech. 48: 407-412. • Viudes de Castro, M.P. y Mocé, E. 2013. ITEA, TOMO I: 428-430. • Viudes de Castro et al., 2014. Theriogenology 81: 1223-1228. • Yasuhara et al., 1983. J. Biochem. 7(5): 593-598.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2013-00058-00-00 del INIA. L. Casares-Crespo ha sido financiada por una beca de formación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y el Fondo Social Europeo.

Tabla 1. Efecto de los distintos inhibidores sobre la motilidad, integridad del acrosoma e inhibición de la actividad aminopeptidasa tras 2 horas de incubación.

Inhibidor	Motilidad (%)	Integridad Acrosoma (%)	Inhibición actividad alanina aminopeptidasa (%)
EDTA 30 mM	85,2±1,6	91,5±1,2	33,17± 2,58 ^a
EDTA 20 mM	87,5±1,6	90,8±1,2	37,59± 2,58 ^a
Cóctel D 1:100	87,8±1,6	91,5±1,2	63,33± 2,58 ^b
Bestatina 10 µM	87,0±1,6	91,6±1,2	65,02± 2,58 ^b
Control (TCG)	87,3±1,6	91,3±1,2	---

^{a,b}: valores con distinta letra en la misma columna difieren significativamente al 95% (P<0,05).

SEMINAL PLASMA AMINOPEPTIDASE ACTIVITY INHIBITION AND ITS EFFECT ON SEMINAL QUALITY PARAMETERS IN RABBIT

ABSTRACT: GnRH analogues can be absorbed via mucosa less efficiently than via parenteral. This difference may be due to the presence of enzymes in the seminal plasma. These enzymes among which aminopeptidases are included, can condition the hormone bioavailability when the induction of ovulation takes places using extenders with GnRH analogue present in them. In this context, the aim of this study was to evaluate the inhibition of aminopeptidase activity in the rabbit seminal plasma with various inhibitors (bestatin, EDTA and a protease inhibitor cocktail of Sigma-Aldrich®) and study its effect on semen quality. Results showed that the presence of inhibitors did not affect the motility neither the acrosome integrity of the samples. On the other hand, the aminopeptidase activity was inhibited by all extender tested. Extenders with bestatin and Sigma's cocktail inhibited significantly the seminal plasma aminopeptidase activity in a greater extent than EDTA extenders (65 and 63% versus 38 and 33% for bestatin, cocktail, 20mM and 30mM EDTA, respectively). In conclusion, since apparently they do not affect sperm quality and are able to inhibited around the 60% of the seminal plasma aminopeptidase activity, the next step would be to add bestatin or the protease inhibitor cocktail to the seminal extender with the hormone and perform artificial insemination.

Keywords: aminopeptidase inhibitors, seminal plasma, rabbit.

LA COMPOSICIÓN DEL DILUYENTE INFLUYE EN LA DINÁMICA DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN EL MORUECO

Yániz, J.L., J. Gosálvez, J. , López-Fernández, C., Santolaria, P.¹

¹Grupo de investigación TECNOGAM, Instituto IUCA, Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N 22071 Huesca. jyaniz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides que contienen ADN dañado potencialmente pueden competir con los espermatozoides con ADN normal, disminuyendo las tasas de éxito de la fecundación. Altos niveles de fragmentación de ADN espermático (SDF) se han asociado con peores resultados de fecundación de ovocitos, de gestación y de calidad embrionaria (Tesarik et al., 2004; Virro et al., 2004). La evaluación de la SDF del semen utilizado con fines de reproducción asistida tiene por lo tanto interés (Gosálvez et al., 2011). La evaluación de la dinámica de SDF por incubación *in vitro* proporciona información clave sobre los cambios de la integridad del ADN en los espermatozoides maduros, que normalmente no son revelados en la evaluación basal de SDF (López-Fernández et al., 2008; López-Fernández et al., 2010). Como las diferencias en la calidad del ADN espermático se han relacionado con la capacidad fecundante del eyaculado (Sakkas et al., 1995; Evenson, 1999), la cinética de la fragmentación del ADN puede ayudar a predecir la fertilidad potencial de una muestra determinada.

La composición de los medios utilizados para diluir muestras de semen puede tener un impacto sobre la magnitud del daño en el ADN y este aspecto debe ser estandarizado para una determinada especie para obtener resultados fiables. En este estudio examinamos el efecto de diferentes diluyentes en la dinámica SDF en espermatozoides de moruecos tras su incubación hasta las 24 h a 37°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen de 24 eyaculados se recogió semanalmente con la ayuda de una vagina artificial de 6 moruecos adultos de la raza Rasa Aragonesa y se procesaron individualmente. Cada eyaculado se diluyó hasta una concentración de 800×10^6 espermatozoides/ml en 8 medios diferentes descritos en estudios previos (Yániz et al., 2005; Yániz et al., 2011): basados en leche, TRIS, citrato, MOPS, TES, HEPES y fosfato, y el diluyente comercial INRA96[®]. Las muestras de semen diluido se almacenaron en tubos de ensayo de vidrio y se incubaron a 37 °C en un baño de agua. A las 0, 3, 6 y 24 h de incubación, el semen se diluyó hasta 20×10^8 espermatozoides/ml en PBS para evaluar fragmentación ADN espermático mediante la técnica SCD (Sperm Chromatin Dispersion test, Halotech-DNA, Madrid; López-Fernández et al.2008). Este test nos indica la presencia de roturas de la cadena de ADN en el espermatozoide tras colocar la muestra en una matriz de agarosa y someterla a un tratamiento químico. Al analizar la muestra con el microscopio de fluorescencia, los espermatozoides no fragmentados presentan halos compactos y pequeños, mientras que los que tienen el ADN fragmentado presentan halos grandes y dispersos.

Los valores obtenidos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete SPSS versión 15.0. El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0,05$. Las diferencias de SDC entre diluyentes para cada tiempo de incubación se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA), seguidos por el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de los diluyentes y tiempo de incubación en la SDF se muestran en la tabla 1. Se obtuvieron SDFs significativamente superiores a 6 y 24 h de incubación en el diluyente basado en leche que en los medios basados en sistemas tampón (Tabla 1). A las 24 h de incubación, el semen diluido en el medio INRA96 también alcanzó un SDF mayor que MOPS, TRIS, citrato y fosfato (Tabla 1).

Las causas subyacentes del efecto del diluyente en la cinética de fragmentación del ADN no están claras pero, dado que los diluyentes utilizados tienen diferente capacidad amortiguadora, las fluctuaciones de pH podrían jugar un papel importante. De hecho, en este experimento se evaluaron los cambios de pH de los medios durante la incubación y se observaron diferencias claras entre los diluyentes (datos no mostrados). El pH más bajo de los medios basados en leche y el INRA al final del período de incubación son coincidentes con niveles más altos de SDF en estos diluyentes. Un estudio previo en los seres humanos demostró que la exposición a pH ácidos puede

ocasionar daños en el ADN (Santiso et al., 2012). Curiosamente, este efecto sólo puede ser evaluado cuando se realiza un enfoque experimental dinámico, pero el efecto negativo debe tenerse en cuenta cuando es necesaria una entrega de semen a largas distancias para realizar la inseminación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Evenson, D.P. 1999. *Reprod. Fertil. Dev.* 11, 1-15.
- Gosalvez, J. 2011. *Theriogenology* 75, 197-205.
- Lopez-Fernandez, C. 2008. *Theriogenology* 70, 898-908.
- Lopez-Fernandez, C. 2010. *Theriogenology* 74, 1362-1370.
- Sakkas, D. 1995. *Biol. Reprod.* 52, 1149-1155.
- Santiso, R. 2012. *Mut. Res.* 734, 41-49.
- Tesarik, J. 2004. *Hum. Reprod.* 19, 611-615.
- Virro, M.R. 2004. *Fertil. Steril.* 81, 1289-1295.
- Yániz, J. 2005. *Theriogenology* 64, 1844-1851.
- Yániz, J.L. 2011. *Small. Rum. Res.* 95, 54-60.

Agradecimientos: Los autores agradecen al CITA (DGA) por su ayuda con la adquisición de muestras de semen. Este trabajo fue financiado por el MINECO (proyectos AGL2011-30353-C02-01 y BFU-2013-44290-R) y la DGA-FSE (proyecto A40).

Tabla 1. Efecto del diluyente sobre fragmentación ADN espermático (SDF) de semen de morueco durante la incubación a 37 °C.

		Diluyente							
	h	leche	INRA	TRIS	MOPS	TES	HEPES	CIT	P
SDF (%)	0	3,8±0,95 ^a	2,8±0,91 ^a	2,4±0,65 ^a	1,7±0,45 ^a	1,9±0,51 ^a	1,0±0,32 ^a	1,6±0,23 ^a	1,0±0,24 ^a
	3	5,1±1,60 ^a	5,6±2,21 ^a	1,4±0,45 ^a	0,9±0,13 ^a	1,3±0,32 ^a	1,3±0,21 ^a	0,3±0,14 ^a	0,8±0,18 ^a
	6	11,0±1,83 ^a	8,3±2,11 ^{ab}	2,2±0,54 ^c	1,8±0,31 ^c	2,0±0,61 ^c	2,4±0,50 ^{bc}	1,7±0,41 ^c	1,5±0,55 ^c
	24	19,6±2,78 ^a	14,5±1,51 ^{ab}	2,1±0,47 ^c	3,0±0,86 ^c	7,3±1,85 ^{bc}	8,2±3,03 ^{bc}	3,2±1,20 ^c	2,7±1,1 ^c

INRA: diluyente INRA-96®; CIT: diluyente basado en citrato; P: diluyente basado en fosfato; ^{a-e}: Diferentes entre filas, P < 0,05; x ± SEM; n = 24.

DILUENT COMPOSITION AFFECTS THE DYNAMICS OF SPERM DNA FRAGMENTATION IN RAM

ABSTRACT: This study was conducted to assess the effect of different semen extenders on the dynamics of sperm DNA fragmentation (SDF) in ram. Second ejaculates from 6 adult males were collected using an artificial vagina and diluted in either INRA-96®, milk, MOPS, TRIS, TES, HEPES, citrate or phosphate-based extenders. Semen samples were incubated at 37 °C and the SDF were assessed after 0, 3, 6 and 24 h intervals. Significantly higher SDF indexes were obtained at 6 h and 24 h of incubation in the milk-based diluent than in all the buffer-based extenders. At 24 h, sperm diluted in INRA also reached a higher SDF than MOPS, TRIS, citrate, and phosphate-based extenders. The diluent had a clear impact on the pH of the samples, with MILK and INRA obtaining lower pH levels at the end of incubation period. It was concluded that the results of the dynamics of sperm DNA fragmentation are highly dependent on the diluent employed during incubation at 37 °C, and this should be taken into account in studies evaluating this parameter.

Keywords: sheep, semen, extender, DNA fragmentation

IMPORTANCIA DE LA VALORACIÓN DE PARÁMETROS APOPTÓTICOS EN MUESTRAS SEMINALES PARA LA SELECCIÓN DE SEMENTALES

Casao, A.¹, Macías A.², Laviña, A.², Cebrián-Pérez, J.A.¹, Muiño-Blanco, T.¹, y Pérez-Pé, R.¹.

¹Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177, Zaragoza.

²ANGRA, Cabañera Real, s/n Zaragoza. adriana@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio fue descubrir las razones de la baja fertilidad obtenida con muestras espermáticas de moruecos que presentaban valores aceptables de parámetros estándar de calidad seminal (viabilidad y motilidad), y que se encontraban incluidos en programas de mejora de la raza Rasa Aragonesa. Se analizaron varios eyaculados de tres machos cuya fertilidad tras inseminación artificial en campo fue inferior al 45%, y se compararon con los de un macho que alcanzó un valor medio del 66%. Este estudio se centró especialmente en el análisis de marcadores apoptóticos, ya que la presencia de espermatozoides apoptóticos en las dosis seminales se ha relacionado con problemas de infertilidad o baja fertilidad en varias especies (Said *et al.*, 2006; Anzar *et al.*, 2002). Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que en semen ovino fresco existe un cierto porcentaje de espermatozoides que presenta marcadores apoptóticos, como la translocación de la fosfatidilserina, la fragmentación del ADN o la presencia de caspasas activas (Martí *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2013), y que su análisis, junto con el de otros parámetros como el estado de capacitación, permite revelar diferencias entre medios de dilución o procesos de manipulación o conservación de dosis seminales que no resultaban evidentes tras la evaluación de los parámetros rutinarios de calidad espermática (Del Valle *et al.*, 2010). Así, las diferencias encontradas en este estudio preliminar entre los eyaculados de machos de alta y baja fertilidad permiten concluir que la evaluación de marcadores no rutinarios de calidad seminal resulta fundamental para mejorar la predicción de la capacidad fecundante de dichos eyaculados, y de este modo, seleccionar adecuadamente a los sementales que van a ser incluidos en un programa de mejora, con el consiguiente ahorro económico y de tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Moruecos adultos, de entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA) y de fertilidad conocida se trasladaron a las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Los animales estudiados fueron un macho de alta fertilidad en inseminación artificial (A, fertilidad = 66%), y tres machos de baja fertilidad (B1, B2 y B3, fertilidad = 36, 39 y 43 %, respectivamente).

Tras un periodo de adaptación, se recogieron los primeros eyaculados de cada uno de los machos mediante vagina artificial y de forma individual, dos veces por semana durante un mes. Tras su obtención, las muestras se diluyeron (1:100 v/v) en un medio compuesto por 0,25 mol/L de sacarosa, 10 mmol/L Hepes, 2 mmol/L de KOH, 5 mmol/L de glucosa, 0,5 mol/L de NaH₂PO₄ y 100 mmol/L de EGTA, y se analizó su motilidad, viabilidad, parámetros apoptóticos (inversión de fosfatidilserina, activación de caspasas y daño en el ADN) y estado de capacitación.

La evaluación de la motilidad se realizó mediante un sistema de análisis computerizado (ISAS 1.0.4; Proiser SL, Valencia, Spain). La determinación de la viabilidad (integridad de la membrana plasmática) se llevó a cabo mediante la doble tinción con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (IP). La traslocación de fosfatidilserina (FS) se evaluó con Anexina V-FITC en combinación con IP. Para la determinación de la actividad de caspasas se utilizó el kit *Vibrant FAM Caspase-3 and -7 Assay* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) combinado con homodímero de etidio. El daño en el ADN se estudió mediante la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated-dUTP Nick End Labelling*) usando el kit *In situ cell death detection kit*, con fluoresceína (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Todos estos parámetros se analizaron por citometría de flujo. La valoración del estado de capacitación se llevó a cabo mediante la tinción con

clorotetraciclina (CTC) (Pérez-Pé *et al.* 2002), y se analizó mediante microscopía de fluorescencia.

Los datos obtenidos se analizaron mediante chi-cuadrado, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los parámetros de motilidad y viabilidad (integridad de membrana plasmática) no mostró diferencias significativas entre los moruecos estudiados. Sin embargo, el estudio de los parámetros apoptóticos reveló que el macho de alta fertilidad (A) presentaba un porcentaje significativamente menor de espermatozoides con inversión de fosfatidilserina ($15,4 \pm 4,3$ %) y daño en el ADN ($27,3 \pm 3,1$ %) que los machos B2 y B3 ($31,2 \pm 8,1$ % y $27,8 \pm 8,4$ % de inversión de fosfatidilserina y $40,8 \pm 4,5$ % y $38,5 \pm 1,1$ % de daño en el ADN para B2 y B3, respectivamente; $P < 0,05$, Fig. 1a y 1c). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con caspasas activas entre los machos baja fertilidad ($22,1 \pm 2,9$ %, $27,4 \pm 5,1$ % y $27,9 \pm 3,7$ % para B1, B2 y B3, respectivamente) y el macho de alta fertilidad ($23,9 \pm 2,9$ %, Fig. 1b).

Por otro lado, el estudio del estado de capacitación de los eyaculados, mediante la tinción con CTC, reveló que el morueco de alta fertilidad presentaba unos porcentajes de espermatozoides capacitados significativamente menores ($26,3 \pm 3,7$ %) que los tres machos de baja fertilidad ($42,1 \pm 6,3$ %, $39,1 \pm 6,3$ % y $52,0 \pm 6,0$ %, para B1, B2 y B3, respectivamente; $P < 0,05$, Fig. 2).

En base a los análisis rutinarios de calidad seminal, es decir, motilidad e integridad de membrana, junto como otros parámetros de comportamiento, los machos B1, B2 y B3 habían sido incluidos como sementales en un programa de selección y mejora de la raza Rasa Aragonesa, dando como resultado unos valores de fertilidad muy bajos cuando sus dosis seminales se usaron para inseminación artificial. Una valoración más exhaustiva de sus eyaculados, incluyendo otros parámetros como los marcadores apoptóticos, especialmente los niveles de inversión de fosfatidilserina y el daño en el ADN, así como el grado de capacitación espermática, hubiese servido para descartar a estos animales como sementales y evitar así tanto los gastos económicos como de tiempo y esfuerzo, derivados de su mantenimiento, entrenamiento, preparación de sus dosis seminales, sincronización de las hembras e inseminación artificial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G., Pauls, K.P., 2002. *Biol Reprod* 66: 354-360.
- Del Valle, I., Mendoza, N., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A., Pérez-Pé, R. y Muiño-Blanco, T., 2010. *Reprod Dom Anim* 45: 260-268
- Martí, E., Pérez-Pé, R., Colás, C., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. 2008. *Anim Reprod Sci.* 106: 113-132
- Mendoza, N., Casao, A., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2013. *Biol Reprod* 88 (6): 149
- Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M. L., Cebrián-Pérez, J. A. and Muiño-Blanco, T. 2002. *61(2):* 226-233.
- Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T., Kriegel, C., Li, L., Glander, H.J., Thomas, A.J., Paasch, U. 2006. *Biol. Reprod.* 74: 530-537

Agradecimientos: Financiado por DGA A-26FSE y CICYT-AGL2013-3328-P

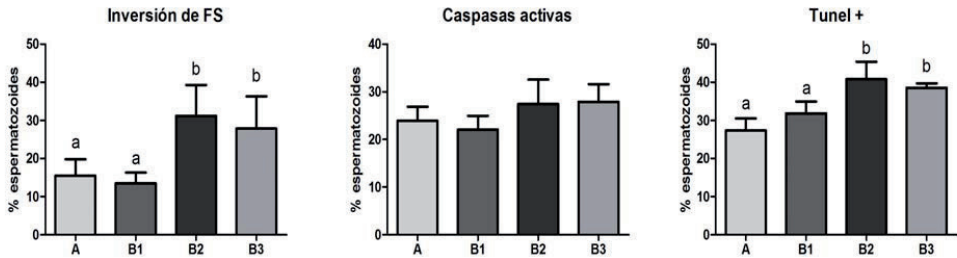


Figura 1. Evaluación de parámetros apoptóticos en espermatozoides de machos ovinos de alta (A) y baja (B1, B2 y B3) fertilidad. Media \pm SEM de n=5. a, b indica $P < 0,05$.

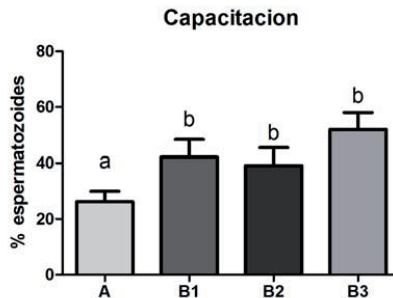


Figura 2. Evaluación del estado de capacitación de espermatozoides de machos ovinos de alta (A) y baja (B1, B2 y B3) fertilidad. Media \pm SEM de n=5. a, b indica $P < 0,05$

RELEVANCE OF THE EVALUATION OF APOPTOTIC PARAMETERS IN EJACULATES FOR APROPIATE SELECTION OF OVINE MALES

ABSTRACT: The aim of this study was to discover the reasons for the low fertility obtained after artificial insemination (<45%) with sperm samples from three rams (B3, B1 y B2) that had acceptable values of standard semen quality parameters (viability and motility). Comparisons of ejaculates of each animal with those of a male (A) who reached high values of fertility (66%) showed no significant differences in motility and viability (plasma membrane integrity) values between them. However, the study of apoptotic parameters revealed that male A had a significantly lower percentage of spermatozoa with inversion of phosphatidylserine ($P < 0.05$) and DNA damage ($P < 0.05$) when compared with males B3 and B2, but not with B1. No significant differences were observed in the percentage of spermatozoa with active caspases among low fertility and high fertility rams. Analysis of the capacitation state revealed that male A had a percentage of capacitated sperm significantly lower ($P < 0.05$) than males with low fertility. On the basis of these preliminary results it would be advisable the inclusion of non-routine semen quality parameters in sire tests in order to improve the prediction of their fertilizing ability.

Keywords: Apoptosis, capacitation, sperm fertility.

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE PROTAMINA1 Y FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN ESPERMA DE MORUECO EXTRAIDO EN PRIMAVERA Y VERANO

Sánchez-Espada AI, Serrano M, Martín B, Arroyo F, González C, Gosálvez J, y Roy R¹.

¹c/ Darwin 2. Universidad Autónoma de Madrid. 28049. rosa.roy@uam.es

INTRODUCCIÓN

La cromatina del espermatozoide posee características excepcionales, se presenta altamente compactada y muy estable debido a los numerosos enlaces disulfuro que existen en sus proteínas, las protaminas. Se ha descrito una alteración de estas protaminas en pacientes con distintos niveles de daño en el DNA (Aoki et al., 2005). Por ello, se piensa que una de las funciones que tendrían las protaminas sería la de proteger el DNA del espermatozoide que tiene que ser introducido en el oocito (Oliva y Dixon, 1999). Una protaminación incompleta produciría un espermatozoide más vulnerable al efecto de agentes como las nucleasas, radicales libres o ciertos mutágenos (Sotolongo et al., 2003). Hay estudios recientes en toro llevados a cabo por Ganguly et al., (2013) en los que se ha visto un aumento de transcritos de PRM1 en espermatozoides con mayor motilidad. Por todo esto, sería interesante determinar los niveles de mRNA de genes, como los de las protaminas, relacionadas con la estructura de la cromatina del espermatozoide y que podrían estar relacionadas con una mayor susceptibilidad a la fragmentación, y así poder determinar con mayor exactitud el potencial fértil de una muestra seminal.

Entre las distintas pruebas que se pueden realizar, aquellas que determinan la fragmentación del DNA de los espermatozoides han adquirido una notable relevancia en los últimos años, ya que en muchos estudios indican que los espermatozoides con DNA defectuoso, pueden tener morfología, motilidad y capacidad de fecundación normal, pero no dar origen a gestaciones viables (Aitken y Krausz, 2001). Por tanto, sería lógico pensar que la transferencia de la molécula de DNA intacta del espermatozoide al óvulo es clave para que una fecundación pueda llevarse a término, especialmente si tenemos en cuenta que, hoy en día, los procesos de reproducción por monta natural en animales han sido sustituidos en muchos casos por procesos de reproducción asistida, dadas sus ventajas para la mejora genética, el aumento en la eficacia reproductora, el control y la prevención de enfermedades, y la reducción en el número de sementales de ganadería entre otras (Salamón, 1990).

En este trabajo hemos estudiado nuevos parámetros que pueden ser usados en los análisis de calidad seminal. Actualmente con la inseminación artificial y con las nuevas metodologías de reproducción asistida es necesario de disponer de parámetros que nos permitan predecir con mayor precisión el poder fecundante de una muestra seminal. Hemos analizado como varían la fragmentación de DNA y la expresión de mRNA para la protamina 1 (*PRM1*) en eyaculados extraídos en dos épocas distintas, con una variación de temperatura y de horas de luz entre ellas: primavera (mayo) y verano (agosto). Los resultados obtenidos muestran que en los eyaculados obtenidos en verano presentan niveles más bajos de fragmentación de DNA y niveles más altos de *PRM1*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio han sido utilizadas muestras de espermatozoides frescas de 35 sementales ovinos de Raza Manchega del centro ovino de Valdepeñas. Todos ellos adultos (entre 2 y 4 años) y adiestrados para la recogida seminal con vagina artificial con hembra señuelo. Se hicieron 2 extracciones a los mismos sementales en fechas distintas: en primavera ("pri"), y en verano ("ver").

Extracción de DNA, mRNA y obtención del cDNA. A partir de muestras en las que se ha eliminado el plasma seminal mediante centrifugación. Se realizan dos lavados con una solución que contiene 110nM NaCl, 5mM KCl y 10mM MOPS [pH 7,4]. El DNA y RNA se extrae con Trizol® LS Reagent (Invitrogen).

Índice de fragmentación mediante SCDtest (Sperm Chromatin Dispersion test). Se ha usado el kit Sperm-Halomax (Chromacell, SL, Madrid) que permite dispersar *in situ* la cromatina de los espermatozoides, que han sido inmovilizados sobre microgeles adheridos a un portaobjetos. Para establecer el índice de fragmentación se cuentan 600 espermatozoides con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Figura 1). Se analizó el porcentaje de

espermatozoides con DNA fragmentado a partir de eyaculados frescos incubados a diferentes tiempos (0 h, 1,30 h, 4,30 h, 24 h y 48h).

Caracterización del polimorfismo tipo SNP en el gen de la PRM1. Amplificación del fragmento de DNA que corresponde al gen de la PRM1. El tamaño del fragmento es 512pb (acceso GenBank: FJ900270.1). El genotipo de 61 muestras se ha establecido mediante secuenciación Sanger en un secuenciador capilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems).

Real time- PCR (RT-qPCR). Los cebadores específicos para llevar a cabo la Q-PCR se diseñaron a partir de la secuencia de PRM1 depositada en GenBank. Uno de los cebadores estaba diseñado entre los dos exones, para evitar amplificar DNA genómico. Se utilizó SYBR Green y el ciclo utilizado fue: 40 ciclos de 3 min a 95°C, 15 s a 95°C y 30 s a 60°C para la desnaturalización, anillamiento y extensión respectivamente.

Análisis estadísticos. Se utilizó el procedimiento de modelos lineales mixtos (MIXED) del paquete estadístico SAS (SAS Version 9.3; SAS Inst. Inc., Cary, NC). El umbral de significación establecido fue 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fragmentación de DNA aumenta con el tiempo transcurrido desde la eyaculación hasta las 48 horas de incubación. A tiempo 0 h, los niveles de fragmentación son muy bajos (entre el 2-3%) y es lo que llamamos fragmentación basal y equivaldría a la fragmentación debida a factores endógenos principalmente. En ambas épocas la fragmentación basal es muy similar, pero al estudiarla de forma dinámica vemos que en todos los tiempos de incubación obtenemos mayores niveles de fragmentación en las muestras obtenidas en primavera (Figura 1).



Figura 1. A) Evolución del índice de fragmentación medio para muestras extraídas en verano (ver) y en primavera (pri), a diferentes tiempos con la técnica SCDt. B) Espermatozoide con halo (fragmentado).

Al comparar la expresión del gen de la PRM1 en las dos fechas de colecta (primavera y verano), hemos observado que la tasa de expresión del gen PRM1 sufre un aumento en las muestras recogidas en verano frente a las de primavera (FC = 1,4). Esto podría relacionarse con el fotoperiodo, con el acortamiento de los días que ocurre desde el solsticio de verano. En primavera sería una época más desfavorable reproductivamente que el verano. Hay estudios recientes en toro llevados a cabo por Ganguly et al., (2013) en los que se ha visto un aumento de transcritos de PRM1 en espermatozoides con mayor motilidad. Por tanto un aumento de transcritos de PRM1 podrían tener relación con una mayor la calidad seminal.

Se caracterizó un SNP (C/T) detectado en el gen de la PRM1 ovina. De los 35 moruecos de los que disponíamos de muestras de semen no obtuvimos ningún individuo homocigoto para el alelo C. Ampliamos la muestra con 26 animales más y obtuvimos 4 CC (Figura 2). Este genotipo está en muy baja frecuencia. Debido a que esta transición ocurre en la zona intrónica, pensábamos que no debería tener un efecto, pero el hecho de no encontrar individuos CC en el centro de inseminación, puede indicar que tiene cierto efecto negativo.

Para los resultados de fragmentación obtenidos con la técnica SCDt, el efecto de la interacción genotipo del SNP detectado en el gen PRM1 y la fecha de colecta (genotipo*fecha colecta) fue altamente significativo ($p < 0,0001$), al igual que el efecto del tiempo (time) en que se midió la fragmentación ($p < 0,0001$). En la tabla 1 se muestra el efecto de cada polimorfismo de la protamina en cada fecha (primavera o verano). Para el nivel de fragmentación del DNA espermático, el genotipo TT del gen de la protamina 1 presentó un índice de fragmentación significativamente ($p < 0,0001$) superior, 9,8% más de

espermatozoides con DNA fragmentado, en las muestras tomadas en primavera (pri) frente a las colectadas en verano (ver). También para el genotipo CT el índice de fragmentación en las muestras de primavera fue significativamente ($p < 0,01$) superior, 4,7% que la de las de verano. Los individuos TT presentan mayores diferencias en fragmentación dependientes de la época de colecta del semen que los heterocigotos CT. Así pues el genotipo del gen de la PRM1 podría estar relacionado con una mayor o menor fragmentación del DNA. Si estos resultados se confirman con un mayor número de muestras, este marcador podría ser utilizado para la selección de sementales con una mejor calidad espermática.

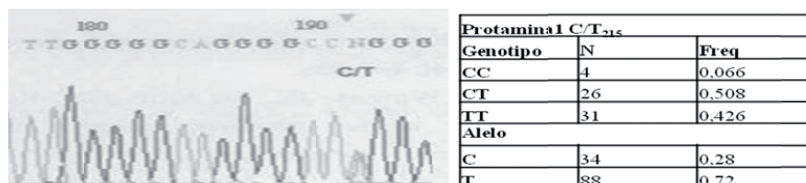


Figura 2. Cromatograma del polimorfismo detectado en el gen de la PRM1 y las frecuencias genotípicas y alélicas en 61 machos de raza manchega.

Tabla 1. Contrastes genotipo*fecha colecta (primavera-verano)

ES: error estándar, DF: grados de libertad

Estimadores contrastes						
Técnica	Contraste	Estimador	ES	DF	Valor t	Pr > t
SCDt	CTver-CTpri	-4,7720	1,7164	291	-2,78	0,0058
	TTver-TTpri	-9,8674	1,6459	291	-6,00	<,0001
	CTver-TTver	1,9374	2,1955	291	0,88	0,3783
	CTpri-TTpri	-3,1579	2,1886	291	-1,44	0,1501

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken R.J. & Krausz C. 2001. *Reproduction*, 122:497–506.
- Aoki V.W. et al. 2005. *Journal of Andrology*, 6(6): 741-748.
- Fernández J.L. et al. 2005. *Fertil Steril*, 84(4): 860.
- Ganguly I. et al. 2013. *Res Vet. Sci*, 94(2): 256-262.
- Oliva R. & Dixon G.H. 1991. *Prog Nucleis Acid Res Mol Biol*, 40: 25-94.
- Salamón S. 1990. *Inseminación Artificial de ovejas y cabras*. Ed. Acribia. España, 1-171.
- Sotolongo B. et al. 2003. *Biol Reprod*, 69: 2029-2035.

Agradecimientos: Este proyecto se ha llevado a cabo gracias a un proyecto financiado por la CAM: CCG10-UAM/SAL-5486 (PROTAGEN)

STUDY OF PROTAMINE1 LEVELS AND DNA FRAGMENTATION IN SPERM OF RAMS OBTAINED IN SPRING AND SUMMER

ABSTRACT: DNA damage is a proven infertility cause and causes problems in the developing embryo. It has been suggested that DNA integrity may be a marker more related to sperm quality. The evolution in time of this damage could be different depending on the degree and type of protamine forming sperm chromatin. These two parameters were studied on ejaculates obtained in spring and summer in 35 Manchega rams. We used the Sperm Chromatin Dispersion technique to measure DNA fragmentation and levels of mRNA for PRM1 by Q-PCR. An SNP C215T gene was detected in the PRM1 to see its possible relation to fragmentation and expression throughout the year. There are differences of expression within the same genotype in spring (pri) and summer (ver). In spring PRM1 gene expression decreases regardless of genotype. DNA fragmentation increases in spring, being higher in TT genotype males and lower in CT genotype ones. This variation in expression could be due to the action of photoperiod, This study could serve to obtain samples of better quality during the summer, selecting the best rams for using in AI.

Keywords: Protamine 1, DNA fragmentation, Fertility.

ANÁLISIS DE LA CROMATINA EN ESPERMATOZOIDES DE *BUFO CALAMITA*

Pardal, S., Crespo-Félez, I., Mata-Campuzano, M., Martínez-Pastor, F. y Arregui, L.
INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España, felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La cría en cautividad de anfibios tiene una importancia creciente, ya que las poblaciones silvestres se encuentran en su mayor parte amenazadas o en retroceso (Tascón, 2003, Gascon et al., 2005). Además, el desarrollo de técnicas de reproducción asistida tiene un papel fundamental para solventar los problemas de reproducción en cautividad y para permitir una adecuada la gestión genética, contribuyendo así a la conservación de estas especies. Un factor importante para la fertilidad espermática es la integridad de la cromatina. En mamíferos, las causas más comunes que afectan a la estructura de cromatina, principalmente causando fragmentación del ADN son: el estrés oxidativo —provocado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Akiten et al., 2010)—, la exposición a contaminantes, el aumento de la temperatura testicular normal y la edad (Agarwal et al., 2003). Para poder identificar estos daños de forma adecuada, es necesario disponer de un método preciso, repetible y que sea rápido y asequible. En el caso de los anfibios, sólo existe una publicación que aplica el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD) en un anuro modelo (Pollock et al., 2014). Sin embargo, el *sperm chromatin structure assay* (SCSA), que se considera el test más fiable y repetible hasta el momento (Evenson, 2013), nunca se ha utilizado en una especie de este grupo. El objetivo de este trabajo fue testar y poner a punto un protocolo de SCSA en un anuro ibérico. El estudio de la fragmentación del ADN espermático y su dinámica es una herramienta importante para la conservación de los anfibios y en estudios sobre biología evolutiva de estas especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos generales fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), y el naranja de acridina fue comprado a Polysciences (Warrington, PA, USA). Se utilizaron 14 machos de *Bufo calamita*, que fueron capturados en el campo y mantenidos en cautividad hasta el fin de los experimentos. Para la inducción de la espermiación cada macho recibió una inyección intraperitoneal con 10 IU de gonadotropina coriónica humana por gramo de peso. Se analizaron 2 recogidas de orina espermática, separadas por 2 h, mediante estimulación de la micción o introduciendo un catéter a través de la cloaca. La concentración de cada muestra se estimó en un hemocitómetro, y se alicuotaron aproximadamente 2 millones de células en tubos con TNE (Tris-NaCl-EDTA). Estos tubos se congelaron y se mantuvieron a -80 °C. El análisis se realizó según Evenson y Jost (2000). Brevemente, 200 µL de muestra se trataron con 400 µL de solución ácida-detergente (150 mM NaCl, 0,1% Tritón X-100, 80 mM HCl, pH 1,2) durante 30 s, añadiéndose entonces una solución de tinción (150 mM NaCl, 100 mM ácido cítrico, 200 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA). A los 3 min las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA), utilizando un láser azul (488 nm) y fotodetectores para fluorescencia roja (670LP) y verde (530/30). Se analizaron 5.000 eventos, analizando los datos con el paquete estadístico R (<http://www.r-project.org>) para obtener los parámetros del SCSA SD-DFI (desv. est. del DNA Fragmentation Index), %DFI (fragmentación del ADN) y %HDS (compactación de la cromatina) (Evenson y Jost, 2000; Evenson, 2013). Estos datos se analizaron mediante modelos lineales de efectos mixtos y mediante análisis de componentes principales (para estudiar el comportamiento de cada macho de acuerdo con los resultados en ambas recogidas). Los resultados se indican como media±desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica SCSA pudo ser utilizada para analizar los espermatozoides de *B. calamita*, obteniéndose los parámetros correspondientes. Los resultados mostraron una gran heterogeneidad entre machos y orden de recogida de muestra (figuras 1a y 1b). En la primera recogida, observamos valores de fragmentación e inmadurez bajos a moderados, de acuerdo con los datos disponibles en mamíferos (Evenson, 2014), que sugieren que valores de %DFI>30% y %HDS>15% están asociados a infertilidad. No obstante, tanto las estrategias reproductivas como la estructura de la cromatina espermática son muy

diferentes entre anfibios y mamíferos (Ausió et al., 2007), por lo que cualquier extrapolación sería, por ahora, aventurada. Los datos de %DFI (Figura 1a) fueron los más heterogéneos. La mayor parte de las muestras proporcionaron valores muy por debajo del 10% ($2,6\% \pm 2,0$) en la primera recogida, excepto un grupo que presentó valores algo más elevados ($14,3\% \pm 3,4$). En la segunda recogida, la mayor parte de los machos produjeron muestras con %DFI menor ($2,6\% \pm 2,3$; $P=0,005$). En cambio, los valores de %HDS (Figura 1b) fueron en general similares tanto entre machos como entre recogidas ($6,2\% \pm 1,7$). Estos datos indican que podemos conseguir espermatozoides maduros de *B. calamita* incluso en recogidas sucesivas, y que esta característica es común a distintos machos. En cuanto a los datos de fragmentación, éstos podrían reflejar una heterogeneidad de la población espermática en algunos machos. Es posible que en la primera recogida haya una mayor proporción de espermatozoides senescentes, los cuales se eliminarían principalmente en esa recogida, presentándose en menor proporción en las siguientes recogidas. No podemos descartar que los machos con bajo %DFI hubiesen eliminado esos espermatozoides espontáneamente antes de realizar las recogidas.

El análisis de componentes principales (PCA, Figura 1c) permitió caracterizar a los machos según los resultados obtenidos en ambas recogidas. Comprobamos que %HDS y las variables relacionadas con la fragmentación SD-DFI y %DFI eran casi ortogonales, indicando que la compactación y la fragmentación espermática son características independientes, como ha sido indicado anteriormente (Evenson, 2013; Mata-Campuzano et al., 2014). El PCA permitió agrupar a los machos en tres conjuntos según su cercanía en el espacio multidimensional definido por las tres variables en los dos tiempos de recogida. Así, el conjunto 1 agrupó a los machos con bajo %DFI en ambas recogidas. El conjunto 2 agrupó 2 machos con el %HDS más bajo en la segunda recogida. En el conjunto 3 se agruparon machos con %DFI moderado en la primera recogida. Dos machos quedaron excluidos al presentar los valores más elevados de %DFI (G) o %HDS (K). La evaluación de la cromatina espermática mediante SCSA, nos indicó que los espermatozoides de los machos de *B. calamita* utilizados en el estudio tenían en general unos niveles de fragmentación del ADN y de compactación aceptables, mejorando en una segunda recogida. Además, los datos obtenidos en esta técnica nos permitieron clasificar a los machos de acuerdo con el estado de la cromatina espermática en las recogidas sucesivas. Este tipo de análisis podrían ser utilizados para evaluar el impacto de distintos factores (manejo, contaminantes, etc.), así como en posibles técnicas de manejo reproductivo en anfibios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A., Saleh, R.A. & Bedaiwy, M.A., 2003. Fertil. Steril. 79(4):829-843.
- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., Hedges, A. & McLachlan, R.I. 2010. Hum. Reprod. 25(10):2415-2426
- Ausió, J., Eirín-López, J.M. & Frehlick, L.J., 2007. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 65:63-79.
- Evenson, D.P., 2013. Methods Mol. Biol. 927:147-164.
- Evenson, D. & Jost, L., 2000. Methods Cell. Sci. 22:169-189.
- Gascon, C., Collins, J.P., Moore, R.D., Church, D.R., McKay, J.E. & Mendelson III, J.R. 2005 Amphibian Conservation Action Plan. IUCN.
- Mata Campuzano, M., Alonso Molero, J. & Martínez Pastor, F., 2014. XXX Congreso Nacional SEF. Barcelona, España.
- Tacon, A. J., 2003. FAO Fisheries Circular, 886, 5-29.

Agradecimientos: A la Comunidad de Madrid por los permisos de captura, las instalaciones y el equipamiento al Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid y al IBIOMED de la Universidad de León. Parte de este estudio fue financiado por el programa CAN grant 2013 del Zoológico de Menfis (EEUU).

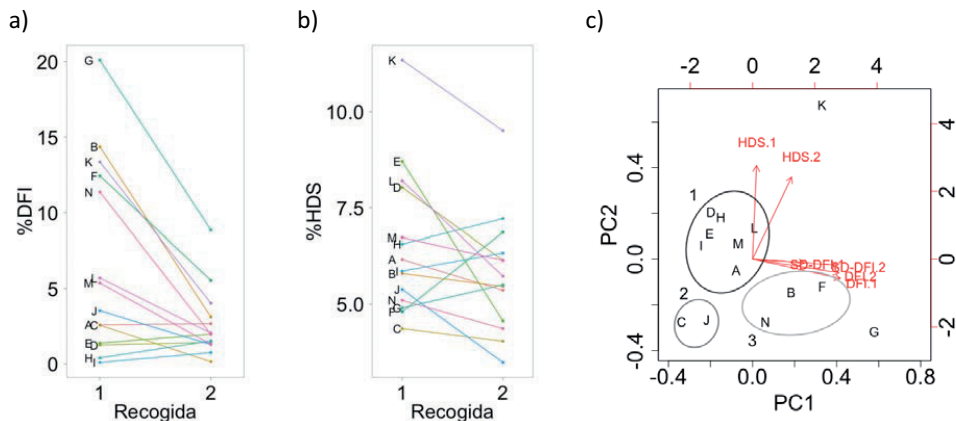


Figura 1. Proporción de espermatozoides con fragmentación del ADN espermático (%DFI, a) o compactación-inmadurez de la cromatina (%HDS, b) en muestras de 14 machos (A-J) procedentes de dos recogidas separadas por 2 h. En cuanto a la fragmentación del ADN, se observa una gran heterogeneidad entre machos y entre ambas recogidas. La subfigura c muestra el resultado de un análisis de componentes principales utilizando las variables SD-DFI, %DFI y %HDS en las dos recogidas (1, 2). Destaca la distinta distribución de los machos y la independencia (ortogonalidad) entre las variables relacionadas con la fragmentación (SD-DFI y %DFI) y %HDS.

ANALYSIS OF THE CHROMATIN OF *BUFO CALAMITA* SPERMATOZOA

ABSTRACT: The application of reproductive techniques is important for the conservation and farming of amphibians. Studies on the status of sperm chromatin are lacking on this group. Therefore, we have tested the sperm chromatin structure assay (SCSA) on 14 males of *Bufo calamita* spermatozoa. Spermiation was induced by hCG, and spermatozoa were analyzed in two successive collections separated by 2 h. DNA fragmentation (%DFI) was low or moderate, below cut-off values for mammals (30%), with males showing a great heterogeneity. Moderate values decreased in the second collection. Chromatin compaction (%HDS) was more homogeneous between males and mostly below 10%. A principal components analysis with SD-DFI, %DFI and %HDS at both collection times allowed to classify the males according to their sperm chromatin characteristics and changes between recovery times. Moreover, fragmentation (SD-DFI and %DFI) and compaction (%HDS) were largely independent variables. SCSA could be useful for studying amphibian sperm chromatin for different purposes and regarding the application of reproductive techniques.

Keywords: Bufo, amphibians, SCSA, sperm chromatin.

EVALUACIÓN DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA EN MUESTRAS SEMINALES PORCINAS

Mondéjar, I., Coy, P. y Gadea, J.

Dept. Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Excelencia Mare Nostrum 37/38. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria IMIB-Arrixaca. 30.100. Murcia. España. jgadea@um.es

INTRODUCCIÓN

El sistema plasminógeno-plasmina es uno de los sistemas más importantes con actividad proteasa en el ambiente extracelular. Es un sistema complejo donde intervienen moléculas activadoras, tipo uroquinasa (uPA) y tipo tisular (tPA), e inhibitoras (PAI-1 y PAI-2). Este sistema está relacionado con diferentes aspectos de la función reproductiva del macho, interviniendo en los procesos de espermatogénesis, capacitación, reacción acrosómica y fecundación (Le Magueresse-Battistoni, 2007; Liu, 2007, Coy et al., 2012, Mondejar et al., 2012, Grullon et al., 2013).

En diversos estudios en la especie humana se han medido los valores de uPA en las muestras seminales y se han relacionado con parámetros de calidad seminal y la fertilidad (Van Dreden et al., 1991, Espana et al., 1993, Arnaud et al., 1994, Liu et al., 1996, He et al., 1999, Wang et al., 2006, Ebisch et al., 2007, Liu 2007, Van Dreden et al., 2007). Sin embargo, no se dispone de información suficiente sobre los valores de uPA en muestras seminales porcinas ni sobre la importancia que esta proteína podría tener en la función reproductiva.

El objetivo por tanto del presente estudio fue evaluar la concentración de uPA en plasma seminal y espermatozoides de verracos fértiles y analizar la posible relación con los parámetros de funcionalidad espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron un total de 21 eyaculados de 6 verracos de fertilidad probada procedentes de un centro de inseminación artificial situado en la Región de Murcia. Se evaluaron los parámetros seminales de las muestras en términos de concentración espermática, motilidad (CASA), viabilidad mediante tinción de eosina-nigrosina, morfología y estado del acrosoma. Se centrifugó (3000 g 10 min) una alícuota de un mL de cada muestra para separar el plasma seminal de los espermatozoides. El plasma seminal y el extracto resultante de la sonicación de los espermatozoides en tampón de lisis con tritón X-100 (1%), mediante el empleo de un sonicador digital (Branson Ultrasonics, Dambury, USA) a una amplitud del 20% y durante 20 segundos sobre baño de hielo, fueron conservados a -80 °C hasta la medición de la concentración de uPA.

La determinación de la concentración de uPA en plasma seminal y espermatozoides se realizó mediante un test Elisa (SEA140Po. Uscn Life Science Inc., Wuhan, China). Los resultados se expresaron en ng de uPA/mL, así como ng/10⁸ espermatozoides. La presencia de uPA en las muestras seminales fue confirmada mediante un estudio de electroforesis SDS-PAGE, seguido de un análisis de Western blot que permitió detectar la proteína uPA que tiene un peso molecular de aproximadamente 53 kDa.

Los datos se muestran como media \pm error estándar de la media. Se aplicó un análisis de correlación de Pearson para relacionar los diferentes parámetros estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de uPA detectados en plasma seminal y espermatozoides (Tabla 1) son, según la información disponible hasta la fecha, la primera referencia en la especie porcina, donde únicamente se dispone de los datos de la valoración de la actividad enzimática (Smokovitis et al., 1987, Zervos et al., 2010).

La concentración de uPA en plasma seminal (17,64 \pm 0,60 ng/mL) se encuentra en un rango similar al descrito por diversos autores que analizan muestras humanas (15,5- 32 ng/mL) (Maier et al., 1991, Espana et al., 1993, He et al., 1999, Van Dreden et al., 2007). Al estudiar la posible relación con los parámetros seminales observamos una relación directa con la viabilidad, motilidad total, motilidad progresiva y la morfología espermática normal (Tabla 1,

$p < 0,05$). Mientras que se detecta una relación inversa con la presencia de gotas citoplásmicas proximales y colas en látigo (Tabla 1, $p < 0,05$). En la especie humana algunos autores han descrito valores de uPA en plasma seminal superiores en muestras normozoospermicas en comparación con muestras oligo o/y astenozoospermicas (Maier et al., 1991, Arnaud et al., 1994, Huang et al., 1997, Wang et al., 2006), así como una relación positiva entre el contenido de uPA y la motilidad y la viabilidad espermática (Wang et al., 2006).

La concentración de uPA en el espermatozoide ($4,81 \pm 0,31$ ng/mL y $1,33 \pm 0,22$ ng/ 10^7 espermatozoides) presenta unos valores mucho más reducidos (del orden de 10 veces menos) que los descritos en la especie humana en el rango entre 1,6 y 7,7 ng/ 10^6 espermatozoides (Maier et al., 1991). Previamente se ha descrito que la actividad activadora del plasminógeno (PPA) asociada a la uPA en plasma seminal y espermatozoides era superior en la especie humana que en la porcina (Smokovitis et al., 1987). Estas diferencias pudieran estar relacionadas con el hecho de que en espermatozoides humanos se ha detectado mediante técnicas inmunológicas la presencia de uPA en la membrana plasmática y acrosomal externa, mientras que en los espermatozoides porcinos únicamente se detecta en la membrana plasmática (Smokovitis et al., 1992). Por otra parte, no se encontró una correlación significativa entre la concentración de uPA en el espermatozoide y los parámetros de funcionalidad espermática con excepción de las gotas citoplásmicas distales, velocidad curvilínea (VCL) y amplitud del desplazamiento lateral (ALH; Tabla 1. $p < 0,05$).

Estos resultados ponen de manifiesto la participación de uPA en la funcionalidad espermática. Es necesario profundizar en el estudio el complejo sistema plasminógeno-plasmina incluyendo sus activadores e inhibidores para poder comprender la verdadera importancia funcional de este sistema en los procesos reproductivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnaud, A., et al., (1994). *Fertil Steril* 61(4): 741-745.
- Coy, P., et al., (2012). *Hum Reprod* 27(7): 1985-1993.
- Ebisch, I. M., et al., (2007). *Fertil Steril* 87(3): 619-626.
- Espana, F., et al., (1993). *Thromb Haemost* 70(6): 989-994.
- Grullon, L. A., et al., (2013). *Reprod Sci* 20(9): 1075-1082.
- He, S., et al., (1999). *Mol Hum Reprod* 5(6): 513-519.
- Huang, X., et al., (1997). *J Tongji Med Univ* 17(4): 213-217.
- Le Magueresse-Battistoni, B. (2007). *Reproduction* 134(6): 721-729.
- Liu, K., et al., (1996). *Mol Hum Reprod* 2(2): 99-104.
- Liu, Y. X. (2007). *Semin Thromb Hemost* 33(1): 29-40.
- Maier, U., et al., (1991). *J Urol* 146(3): 906-908.
- Mondejar, I., et al., (2012). *Fertil Steril* 97(2): 453-461.
- Smokovitis, A., et al., (1987). *Fibrinolysis* 1(4): 253-257.
- Smokovitis, A., et al., (1992). *Int J Fertil* 37(5): 308-314.
- Van Dreden, P., et al., (2007). *Semin Thromb Hemost* 33(1): 21-28.
- Van Dreden, P., et al., (2007). *Semin Thromb Hemost* 33(1): 21-28.
- Van Dreden, P., et al., (1991). *Andrologia* 23(1): 29-33.
- Wang, L., et al., (2006). *Zhonghua Nan Ke Xue* 12(9): 791-793.
- Zervos, I. A., et al., (2010). *Reprod Domest Anim* 45(6): e440-446.

Agradecimientos: Ministerio de Economía (MINECO) y FEDER (Proyecto AGL2012-40180-C03-01). CDTI (Proyecto IDI-20120531)

Tabla 1. Coeficientes de correlación de Pearson entre los valores de uPA en plasma seminal y espermatozoides y diversos parámetros de funcionalidad espermática.

	Media±sem	uPA Plasma Seminal (ng/mL)	uPA Espermatozoide (ng/mL)	uPA Espermatozoide (ng/10 ⁷ células)
Viabilidad (%)	78,02±2,50	0,54**	0,39	0,17
Motilidad (%)	70,28±2,55	0,51*	0,31	0,25
Motilidad prog. (%)	51,53±4,04	0,47*	0,07	0,09
Morfología (%)	91,79±2,21	0,79*	-0,04	-0,24
Gota Proximal (%)	2,20±1,33	-0,88*	-0,10	0,11
Gota Distal (%)	2,03±0,62	0,15	0,44	0,72*
Cola látigo (%)	2,11±1,06	-0,84*	-0,05	0,14
Acrosoma (%)	83,49±2,94	0,44	0,18	0,18
VCL (µm/s)	71,1±3,44	0,12	0,52*	0,13
ALH (µm)	1,74±0,13	0,20	0,43*	0,10

*Probabilidad <0,05; **Probabilidad <0,01

UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR MEASUREMENT IN PORCINE SEMINAL SAMPLES

ABSTRACT: Plasminogen-plasmin system has been related to different process of the male reproductive function, as spermatogenesis, sperm capacitation, and fertilization. However, the specific role and importance of uPA for the pig male reproductive function is not well known. The concentration of uPA in seminal plasma (17.64 ± 0.60 ng/mL) and spermatozoa ($4,81 \pm 0.31$ ng/mL and $1,33 \pm 0.22$ ng/10⁷ spermatozoa) were measured in 21 seminal boar samples. A positive relationship between uPA concentration in seminal plasma and sperm functional parameters (motility, viability and morphology) were found ($p < 0.05$). On the other hand the uPA concentration in the spermatozoa was related to the presence of cytoplasmic droplets and CASA motility parameters as curvilinear velocity (VCL) and amplitude of lateral head displacement (ALH). In our knowledge, it is the first report of the measurement of urokinase in porcine seminal plasma and spermatozoa.

Keywords: sperm parameters, pig, urokinase

EFECTO DE LA ESTACIÓN DE CUBRICIÓN SOBRE LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS DE CERDAS EN ARAGÓN

Galé, I¹., Izaquirre, M²., Grandía, J³., Daza A⁴.

¹ Cooperativa San Miguel. Tauste (Zaragoza) ² SAT Ganadera Unida Comarcal. Valderrobles (Teruel) ³ Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza ⁴ Departamento de Producción Agraria (Unidad de Producción Animal). Escuela T.S de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid. argimiro. daza@upm.es

INTRODUCCIÓN

La estación, principalmente mediante la influencia de la temperatura y del fotoperiodo influye sobre un conjunto importante de variables reproductivas de la cerda (Enne y Greppi, 1993 ; Daza, 2000). El estrés calórico genera desviaciones importantes en el estado hormonal de la cerda. Temperaturas postdestete próximas a 27°C aumentan los niveles de corticosteroides en sangre y la producción de catecolaminas que estimulan la liberación de ACTH según un patrón de retroalimentación positivo ACTH-corticosteroides de la corteza adrenal que impide la ovulación mediante la inhibición de la LH y el estradiol (Fialho et al., 2004). El efecto estresante de las temperaturas elevadas deriva en que el sistema nervioso central al responder al estrés, vía eje adrenal, inhiba la secreción de GnRH y, como consecuencia, la liberación de gonadotropinas. La respuesta del organismo a reducir la temperatura corporal deriva en una reducción del flujo sanguíneo del útero, oviductos y ovarios, apareciendo subnutrición de los embriones y afectando negativamente a la implantación de los mismos en la pared uterina (Fialho et al., 2004 ; Sutherland et al., 2006 ; Córdova et al., 2007). En el presente estudio, de tipo descriptivo, se estudia el efecto de la estación de cubrición sobre las variables reproductivas de cerdas en el marco productivo de dos explotaciones de Aragón.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo se desarrolló en dos explotaciones situadas en Valderrobles (Teruel) (latitud: 40°, 55', 31" N y temperaturas medias de julio y agosto próximas a los 23°C) En una de ellas, de selección, cuya base animal responde a cerdas Landrace (LR) y machos conformados Large White (LW) (explotación V) se controlaron 372 partos y en otra, de producción, que adquiere hembras Large White x Landrace de la primera y utiliza machos terminales Duroc (D) (explotación A) se controlaron 1.362 partos. En ambas explotaciones se recabaron datos productivos de fertilidad (F) [(cerdas paridas/cerdas puestas a cubrición al primer celo postdestete) x 100], lechones nacidos (LN), nacidos vivos, (LNV), nacidos muertos (LNM), lechones destetados (LD), repeticiones de celo postdestete (RC) e intervalo destete-cubrición fértil (IDCF) a lo largo del año 2013. El manejo alimenticio e higiénico de cerdas y lechones fue similar en las dos explotaciones, las cuales disponen de ventilación dinámica y de refrigeración por humectación en maternidad y cubrición-control –gestación. Las explotaciones se manejan por lotes con un desfase entre ellos de una semana, por lo que la unidad experimental considerada en este experimento ha sido el lote semanal de cerdas. Los datos obtenidos se estudiaron mediante análisis de covarianza que incluía como efectos principales la explotación y la época de parto, la interacción entre ambos factores y el tamaño del lote de cerdas como covariable, que fue retirado del modelo al no ser significativo. También, mediante regresión simple, se relacionan varias variables reproductivas. Los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS-16

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los resultados de la Tabla 1 se deduce una mayor productividad de la explotación V, en términos de lechones destetados por ciclo, debido a su mayor prolificidad. Este resultado puede explicarse porque la base animal de la explotación V son cerdas LR de elevada prolificidad y machos LW conformados que generan madres (LW x LR) para la explotación A en donde se utiliza como macho terminal al D. También puede observarse como la fertilidad se reduce en las cubriciones de primavera y verano como consecuencia probable de las elevadas temperaturas acontecidas en la nave de cubrición-control. El menor número medio de repeticiones de celo y, por ende, el intervalo medio destete-cubrición fértil más corto

correspondieron a las cubriciones de invierno. Sin embargo, la estación de cubrición no tuvo efecto significativo sobre el resto de las variables reproductivas y de mortalidad de lechones. El tamaño del lote no tuvo influencia sobre las variables reproductivas. La interacción explotación (E) x época de cubrición (EC) para la variable LNV detectó que en la explotación A hubo diferencias según estación mientras que en la V no se observó efecto de la estación sobre el número de lechones nacidos vivos.

La relación encontrada entre LNM y LN respondió a la ecuación:

$$\text{LNM} = -1,18 + 0,17 \text{ LN} \quad (R^2 = 0,21, \text{ RSD} = 0,39, P < 0,0001).$$

Así mismo, la relación MND % y LNV se ajustó a la ecuación:

$$\text{MND} (\%) = -28,97 + 3,41 \text{ LNV} \quad (R^2 = 0,37, \text{ RSD} = 5,1, P < 0,0001)$$

La mayoría de los experimentos al respecto han observado mayores intervalos desde cubrición fértil en verano que en el resto de las estaciones del año debido al efecto negativo de las elevadas temperaturas sobre la aparición del celo (Clark et al., 1986 ; Hancock, 1988) aspecto que ha sido observado en el presente estudio, aunque no faltan experimentos realizados en Aragón (Daza et al., 1989) que no han encontrado efecto de la estación de parto sobre la duración del intervalo cubrición fértil subsiguiente cuando se controlaba adecuadamente la temperatura en cubrición -control desde mayo a septiembre. La duración más reducida de los intervalos destete-cubrición fértil de invierno podría explicarse por el efecto positivo sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario del incipiente fotoperiodo creciente (Hughes y Varley, 1983), efecto que podría ser anulado en primavera y verano por las elevadas temperaturas. A tenor de los resultados obtenidos en este experimento, se concluye que parece necesario mejorar los sistemas de refrigeración en las explotaciones porcinas, en lo que concierne al diseño, cálculo y mantenimiento, con el fin de optimizar la fertilidad en primavera-verano de las cerdas reproductoras.

Tabla 1. Influencia de la explotación (E) y de la época de cubrición (EC) sobre los resultados reproductivos.

	n	F %	LN	LNV	LNM	LD	MN %	MND %	RC	IDCF (días)
E										
A	52	82,76 ^b	11,6 ^b	10,76	0,84	9,85 ^b	7,28	8,12	3,95 ^a	11,71 ^a
V	45	87,64 ^a	12,16 ^a	11,18	1,01	10,29 ^a	8,03	9,15	0,85 ^b	9,23 ^b
sem		1,68	0,16	0,16	0,01	0,12	0,80	0,97	0,27	0,63
EC										
Otoño	26	86,83 ^a	11,70	10,86	0,83	9,93	7,11	9,1	2,11 ^{ab}	10,23 ^{ab}
Veran	22	82,29 ^b	12,18	11,28	0,96	10,38	7,74	8,4	3,15 ^a	12,40 ^a
Invier	24	90,22 ^a	12,10	11,2	0,89	10,15	7,35	9,07	1,63 ^b	8,69 ^b
Prima	25	81,46 ^b	11,54	10,55	1,01	9,81	8,42	7,98	3,21 ^a	11,12 ^a
sem		1,50	0,23	0,23	0,14	0,17	1,16	1,43	0,27	0,91
p E <		0,045	0,017	0,07	0,22	0,01	0,51	0,48	0,0001	0,0033
p EC <		0,038	0,16	0,09	0,81	0,10	0,86	0,93	0,011	0,043
p ExEC		0,47	0,14	0,044	0,88	0,09	0,66	0,41	0,09	0,57
cov tl		0,87	0,38	0,36	0,65	0,29	0,75	0,93	0,76	0,65

n = nº de lotes de cerdas, sem = error estándar de la media. MN = mortalidad de lechones al nacimiento, MND = mortalidad de lechones desde el nacimiento hasta el destete. La mortalidad de lechones durante la lactación se estudió en los lotes de cerdas en los que no se retiraron ni se adoptaron lechones: 52 y 39 lotes en las explotaciones A y V respectivamente y 25, 20, 24 y 22 lotes para las estaciones otoño, verano, invierno y primavera respectivamente. El nº de lotes de cerdas para el IDCF fue de 52 y 44 en las explotaciones A y V respectivamente y 25, 22, 24 y 25 en otoño, verano, invierno y primavera respectivamente, tl = tamaño de lote. Medias con distintos superíndices difieren P<0,05.

Agradecimientos: Este proyecto (Welfare Breeding Pigs) ha sido financiado por el MAGRAMA. Nuestro agradecimiento a la cooperativa Ganadería Unida Comarcal (GUCO) por su estimable colaboración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clark, JR., Komkov, A., Tribble, L.F. 1986. Theriogenology, 26, 299-308
- Córdova-Izquierdo, A., Córdova Jiménez, M.S., Córdova Jimñenez, C.A., Guerra, J.E. 2007. Redvet (Revista Electrónica Veterinaria, Vol VIII, nº 12 B, 10 pp. • Daza, A. 2000. En: Producción Porcina: aspectos claves. Ed C.Buxadé. pp 151-174. Ed Mundi Prensa. Madrid. • Daza, A., Ovejero, I., Pérez-Guzmán, M.D, Buxadé, C. 1989. Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales, 4, 163-174
- Enne, G., Greppi, G.F.1993. Pig News and Information, 14, 105N-112N
- Fialho, F.B., Van Milgen, J., Noblet, J., Quiniou, N. 2004. Journal of Animal Science, 79, 135-148.
- Hancock, R.D. 1988. Veterinary Record, 123, 413-416.
- Hughes, PE., Varley, M.A. 1983. Reproducción en el cerdo. Ed Acibia. Zaragoza
- Sutherland, M.A., Niekamp, S.R., Rodríguez-Za, S.L., Salak- Jonson, J.L. 2006. Journal of Animal Science, 84, 588-596.

EFFECT OF MATING SEASON ON REPRODUCTIVE PERFORMANCES IN SOWS IN ARAGON (SPAIN)

In a selection farm 372 farrowings from Landrace sows were controlled, while 1,362 farrowings from crossbreed Large White x Landrace sows from a production farm were also controlled. Both farms are located in Aragón (Spain) (40°, 55', 31" N). In the two farms the mating-prenancy and maternity housings are cooled by means of cooling pads Effects of farm and mating season on reproductive results were studied. The reproductive results from Landrace sows from the selection farm were significantly better ($P < 0.05$) than those of the crossbreed Large White x Landrace sows from the production farm. The sows that were mated during the spring or summer had a fertility significantly lower ($P < 0.05$) and a weaning-to-conception interval significantly longer ($P < 0.05$) than those that were mated in autumn and winter. The interaction farm x mating season was not significant for most reproductive variables. Positive and significant ($P < 0.05$) relations between stillborn piglets and prolificacy and between preweaning mortality and live born piglets were observed.

Key words: sow, reproductive performance, sasonal effects.

LA PRESENCIA DE LOS MACHOS CABRÍOS SEXUALMENTE ACTIVOS EVITA EL ANESTRO ESTACIONAL EN LAS HEMBRAS

Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Hernández, H., Keller, M., Poindron, P., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Vielma, J., Fernández, I.G., Chemineau, P.

Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, C.P. 27054, Torreón, Coahuila, México. joaldesa@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Las cabras del norte de México presentan anestro estacional de enero-febrero a agosto-septiembre. En los machos de esta raza, el reposo sexual ocurre de enero a junio (Delgadillo, 2011). El fotoperiodo es el responsable de esta estacionalidad reproductiva. Sin embargo, la introducción de machos en un grupo de cabras en anestro estacional, induce el estro y la ovulación. A este fenómeno se le conoce como "efecto macho" (Chemineau et al., 2006). La eficiencia del "efecto macho" depende de varios factores, incluyendo la intensidad del comportamiento sexual del macho. En efecto, los machos inducidos a una intensa actividad sexual durante el reposo, al someterlos a tratamientos fotoperiódicos, son más eficientes que los machos en reposo sexual, para inducir la ovulación y el comportamiento de estro en las cabras en anestro estacional (Delgadillo et al., 2002). Estos datos sugieren que el macho puede ser más importante de lo que se piensa, en el control de la estación de anestro de las hembras. Por tanto, nuestra hipótesis es que, en una raza caprina estacional y fotosensible, la presencia permanente de machos sexualmente activos, podría impedir la aparición del anestro estacional de las hembras, y en consecuencia, mantener sus ciclos ovulatorios todo el año.

MATERIAL Y MÉTODOS

Utilizamos hembras caprinas adultas y múltiparas. Un primer grupo de cabras (n=11) permaneció completamente aislado de los machos. Un segundo grupo de cabras (n=13) estuvo en contacto con los machos control, mantenidos bajo el fotoperiodo natural, los cuales desplegaban intenso comportamiento sexual solamente de julio a diciembre. Un tercer grupo de cabras (n=14) estuvo en contacto con machos sexualmente activos todo el año: de enero a junio con machos foto-estimulados (ver tratamientos fotoperiódicos de machos), y de julio a diciembre con machos no foto-estimulados, los cuales desplegaban intenso comportamiento sexual de julio a diciembre, durante la estación natural de reproducción. En estos dos últimos grupos, los machos sexualmente activos y los controles se reemplazaron cada 2 meses durante el estudio. Las hembras de estos dos grupos se dividieron en dos subgrupos de 7 o 6 animales, para que cada uno de ellos estuviera con un macho, y evitar así peleas y accidentes entre los machos. Los subgrupos eran divididos solamente con una barrera de madera que permitía el contacto visual, olfatorio y corporal a nivel de la cabeza entre los animales del mismo grupo. En abril del segundo año, dos meses antes de terminar el estudio, un macho sexualmente activo se retiró de un subgrupo de cabras, y un macho control de un subgrupo de cabras.

Los tratamientos fotoperiódicos se aplicaron a machos cabríos vasectomizados. Los machos control (n=14) se alojaron en un corral abierto y sombreado bajo las variaciones del fotoperiodo natural. Estos machos presentaron intensa actividad sexual de manera natural de julio a diciembre. Tres grupos de machos cabríos (n=4/grupo, 2 de los cuales se utilizaron con las hembras) se alojaron en corrales abiertos y sombreados y se sometieron a 2 meses de días largos (16 horas de luz/día) para inducir su actividad sexual: grupo 1, 15 septiembre-15 noviembre; grupo 2: 1 noviembre-31 diciembre; grupo 3: 15 diciembre-15 febrero. Después del tratamiento luminoso, los machos se sometieron al fotoperiodo natural, y no recibieron (grupos 1 y 2) o recibieron (grupo 3), la inserción de 2 implantes subcutáneos de melatonina. Los machos de los grupos 1, 2 y 3, presentaron intensa actividad sexual en enero-febrero, marzo-abril y mayo-junio, respectivamente (Delgadillo et al., 2015).

Las ovulaciones se determinaron a través de la progesterona plasmática, en muestras sanguíneas obtenidas una vez por semana. La progesterona se determinó por la técnica

inmunoenzimática. La sensibilidad del ensayo fue de 0,25 ng/ml. Los CV intra e inter ensayo fueron de 7 y 3 %, respectivamente.

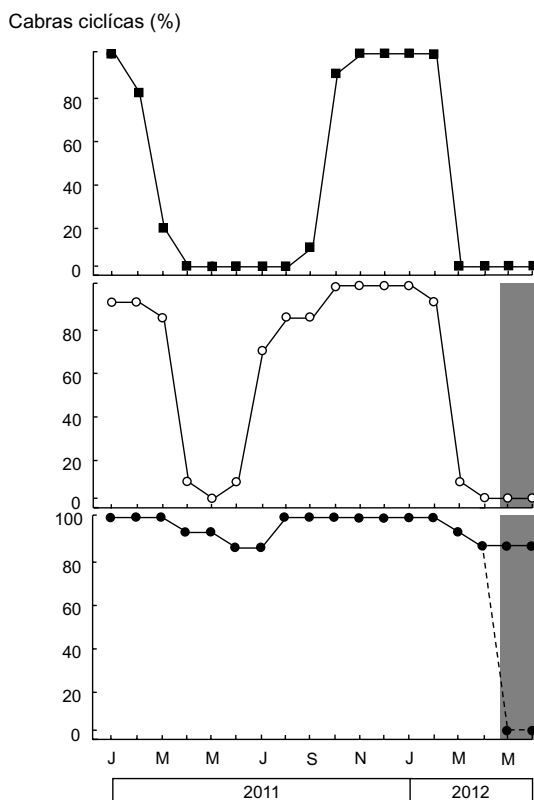


Figura 1. Actividad ovulatoria de las cabras aisladas de los machos (■), en contacto con machos control (○), o con machos sexualmente activos (●); adaptado de Delgadillo et al., 2015).

RESULTADOS

Doce de las 14 cabras expuestas de manera permanente a los machos sexualmente activos presentaron ciclos ovulatorios continuos durante el periodo de anestro; las otras dos hembras presentaron anovulación durante 84 (junio-agosto) y 154 días (abril-agosto). En cambio, todas las cabras en contacto con los machos control o aisladas de los machos, presentaron periodos de anestro estacional muy marcados ($P < 0,001$, entre el grupo en contacto con machos sexualmente activos y los otros dos grupos). Las hembras expuestas a los machos control iniciaron su actividad ovulatoria el 27 julio \pm 9 días, mientras que aquellas totalmente separadas de los machos reiniciaron esta actividad el 17 de octubre \pm 7 días, teniendo un anestro de 142 ± 14 y 242 ± 10 días, respectivamente ($P < 0,0001$). En 2012, los resultados fueron similares: las mismas doce de las 14 hembras que estuvieron en contacto con los machos sexualmente activos, presentaron ciclos ovulatorios hasta junio (fin del experimento), mientras que las hembras con los machos control o separadas de los machos, presentaron anestro estacional (Figura 1). Al retirar los machos sexualmente activos del subgrupo de cabras que estaba ciclando en abril, la actividad ovulatoria de éste cesó inmediatamente después del final de la fase lútea en curso; en cambio, casi todas las hembras que permanecieron con los machos sexualmente activos ovularon en mayo y junio

(0/7 vs. 6/7; $P=0,005$; véase las partes sombreadas de la Figura 1). En contraste, el retiro de los machos control del subgrupo de cabras que estaban anovulatorias, no modificó su actividad ovárica, y todas las cabras permanecieron en anestro estacional, tal y como habían estado en los dos meses precedentes al retiro del macho.

DISCUSIÓN

El papel del comportamiento sexual del macho en la estacionalidad reproductiva de la hembra jamás se había explorado en ninguna especie, a pesar de conocer el efecto estimulador del macho sobre la reproducción de la hembra (Delgadillo et al., 2009). Además, nunca se demostró si los estímulos sensoriales pueden suprimir completamente las variaciones estacionales de la actividad sexual en las hembras. En el presente estudio disociamos la estacionalidad del comportamiento sexual del macho, de la actividad sexual de la hembra. Los efectos de esta disociación mostraron que la presencia permanente de los machos sexualmente activos mantuvo la ciclicidad ovárica de las cabras, eliminando completamente la inhibición estacional de la reproducción provocada por el fotoperiodo. La falta de anestro en las cabras en contacto con los machos sexualmente activos, se debió principalmente a la actividad sexual de éstos, y no a otros factores potencialmente inductores de la actividad sexual como el “efecto hembra” (estimulación de una hembra por otra que está en actividad sexual). Si hubiese existido un efecto hembra, algunas cabras sin macho hubieran mantenido su ciclicidad ovulatoria, o el inicio del periodo de anovulación al retirar el macho, se hubiera presentado de manera progresiva. Por tanto, en el presente estudio, la ciclicidad ovulatoria de las cabras durante el anestro estacional no se debió a las relaciones socio-sexuales entre hembras, sino a la presencia de machos sexualmente activos. Nuestros resultados sugieren que al menos en cabras, la actividad sexual del macho es tan importante como el fotoperiodo, en el control del ritmo anual de la actividad ovulatoria. Además, sugieren el desarrollo de nuevas técnicas libres de hormonas exógenas para inducir la actividad sexual en el anestro de las especies de interés agronómico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chemineau et al., 2006. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 417-429.
- Delgadillo 2011. *Animal* 5, 74-81.
- Delgadillo et al., 2009. *Behav. Brain Res.* 200, 304-314.
- Delgadillo et al., 2015. *Horm. Behav.* 69, 8-15.

Agradecimientos: Financiado parcialmente por CONACYT-ANR (159884), Dirección de Investigación y Subdirección de Posgrado de la UAAAN. Los autores agradecen a B. Malpoux, J.A. Abecia, A.L. Laisné, D. López, J. Salazar y J. García por su apoyo en la realización del presente estudio. #Parte de estos resultados se publicaron inicialmente en la revista *Hormones & Behavior*, Delgadillo et al., 2015.

THE PRESENCE OF SEXUALLY ACTIVE MALE GOATS AVOIDS THE SEASONAL ANOESTRUS IN DOES

ABSTRACT: We determined whether the presence of sexually active males prevents the display of seasonal anestrus in goats. We artificially induced strong sexual activity in bucks from January to June by subjecting them to long days. We also used control males that displayed intense sexual activity only from July to December. These sexually active males were placed with females all the year round. The continuous presence of these sexually active males prevented the anestrus season in goats, which then cycled all the year round. In contrast, females with control males or isolated from them, displayed seasonal anestrus for about 5 months.

Keywords: caprine, ovulation, photoperiod, sexual behavior.

EL CONTACTO PERMANENTE CON MACHOS ESTIMULADOS CON FOTOPERIODO ARTIFICIAL Y MELATONINA MODIFICA LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE OVEJAS RASA ARAGONESA EN PRIMAVERA

Abecia, J.A., Flores, J.A., Keller, M., Forcada, F., Duarte, G., Chemineau, P., Delgadillo, J.A.

I.U.C.A. Depto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. alf@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La raza Rasa Aragonesa presenta una reducida estacionalidad sexual, con un periodo de anestro de aproximadamente tres meses entre mayo y agosto (Forcada et al. 1992), aunque un porcentaje variable de ovejas (10-45%) muestran ovulaciones durante dicho periodo. La duración del periodo de anestro se ve influenciada, además del fotoperiodo, por la nutrición (Forcada y Abecia, 2006) y factores sociales (Lindsay, 1996). Así, el “efecto macho”, es decir, la introducción de un macho en un grupo de hembras anéstricas, estimula la ovulación. En la especie caprina, por ejemplo, la mayoría de las hembras ovulan (>90%) cuando son expuestas a machos inducidos a una intensa actividad sexual al exponerlos previamente a días largos (Delgadillo et al., 2002). Además, la presencia continua de machos sexualmente activos evita la aparición del anestro estacional (Delgadillo et al., 2015). Los resultados obtenidos en la especie caprina sugieren que la actividad sexual del macho juega un papel decisivo en el desarrollo de la actividad sexual anual de las hembras. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la presencia de machos previamente estimulados sexualmente por tratamiento lumínico y melatonina puede provocar la reducción de la duración de anestro estacional en las ovejas, manteniendo su actividad ovulatoria en primavera.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (41° 40'N), con protocolos aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal. Todos los animales se alimentaron para cubrir sus necesidades de mantenimiento y recibieron agua y sales minerales a voluntad.

Se utilizaron 10 machos adultos vasectomizados de raza Rasa Aragonesa (PV (\pm S.E.M.): 92,9 \pm 2,4 kg; CC: 3,35 \pm 0,07). Un grupo (T1, n=4), se expuso a un periodo de 2 meses de días largos (16 h luz/día) entre el 1 de diciembre y el 31 de enero. Otro grupo (T2, n=4) recibió el tratamiento lumínico del 1 de enero al 28 de febrero. Al final de los tratamientos de luz, los machos recibieron tres implantes subcutáneos de melatonina (Melovine, CEVA Salud Animal) y retornaron a condiciones de luz natural (T1: 1 febrero; T2: 1 marzo). El grupo Control (C, n=2) permaneció bajo condiciones de luz natural (15 h y 12 min, y 9 h y 10 min de luz, en los solsticios de verano e invierno, respectivamente). En el caso de las hembras, se utilizaron 31 ovejas de la misma raza (PV: 66,5 \pm 1,5 kg; CC: 3,35 \pm 0,07), divididas en dos grupos y alojadas en naves diferentes, a 100 metros de distancia entre sí. Un grupo inició el contacto con los machos tratados con luz+melatonina el 27 de febrero, finalizando el 31 de julio (Grupo “Machos Tratados”, n=16), mientras que el otro grupo permaneció como control, con los machos no tratados (Grupo “Machos Control”, n=15). Los machos T2 reemplazaron a los machos T1 el 1 de mayo. Los machos portaban arneses con pastillas coloreadas para marcar las ovejas en celo, anotándose las ovejas marcadas diariamente.

Se tomaron muestras semanales de sangre para determinar los niveles de progesterona en las ovejas. El plasma fue analizado mediante RIA, fijándose un nivel mínimo de 1 ng/ml de progesterona para determinar ovulación.

El anestro se definió como un periodo superior a 20 días entre dos detecciones de celos sucesivas, y su longitud como el número de días entre ambos eventos. El periodo anovulatorio de definió como un periodo con dos o más valores sucesivos de progesterona por debajo de 1 ng/ml, y su longitud como el número de días entre la fecha del último valor por debajo de 1 ng/ml y el primer valor por encima de 1 ng/ml. Una oveja de cada grupo de

excluyó de estos cálculos debido a la presencia de cuerpo lúteo permanente. El número de ovulaciones y celos se calculó para cada mes del estudio, y sus frecuencias (porcentajes), comparadas mediante Chi-cuadrado o el test de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde marzo hasta junio, el grupo expuesto a los machos tratados presentó un mayor porcentaje de ovejas en celo que el grupo control ($P < 0,05$) (Figura 1). La mayoría de las ovejas expuestas a los machos foto-estimulados presentaron signos de celo permanentemente durante el anestro estacional. Por el contrario, todas las ovejas control detuvieron en algún momento su actividad estral durante algún periodo de tiempo. La longitud del periodo de anestro estacional fue por tanto, significativamente superior en el lote control que en el lote expuesto a machos tratados (89 ± 9 vs. 26 ± 10 días, respectivamente; $P < 0,0001$). El análisis de los niveles plasmáticos de progesterona (actividad ovulatoria) reveló que 13 ovejas del grupo "Machos Tratados" presentaron actividad ovulatoria desde marzo hasta julio, una deteniéndose en junio y dos en julio. Siete de las ovejas del grupo "Machos Control" presentaron ovulaciones durante el experimento, y las otras siete dejaron de ciclar en algún momento, dando lugar a un periodo de anestro ovulatorio significativamente más largo (18 ± 7 días) que el presentado por las ovejas del grupo de machos tratados (3 ± 3 días; $P < 0,05$). La evolución mensual de estas ovulaciones indica que el grupo que convivió con machos sin tratar lumínicamente mostró un mayor porcentaje de ovulaciones silenciosas que el grupo "Machos Tratados" en marzo ($P < 0,05$) y abril ($P < 0,01$).

De manera global, las ovejas del grupo "Machos Tratados" alcanzaron 122 ovulaciones a lo largo del periodo estudiado, 95,9% de ellas acompañadas de celo. Este porcentaje fue significativamente inferior en el grupo control, con solo 58 de 100 ovulaciones mostrando celos (58%), es decir un mayor porcentaje de ovulaciones silenciosas que el grupo tratado (4 vs 42%, respectivamente; $P < 0,001$).

En un trabajo previo de nuestro grupo en la especie caprina (Delgadillo et al., 2015), se ha demostrado que cabras expuestas a machos activos durante el periodo de anestro estacional no detuvieron su actividad ovulatoria, y que dicha ciclicidad no se debió a las relaciones socio-sexuales entre hembras, sino a la presencia de machos sexualmente activos, sugiriendo que al menos en cabras, la actividad sexual del macho es tan importante como el fotoperiodo en el control del ritmo anual de la actividad ovulatoria. Nuestros resultados son similares a la experiencia en caprino, aunque la alta frecuencia de ovulaciones silenciosas encontradas en el presente trabajo puede indicar que la intensidad del anestro estacional de las ovejas Rasa Aragonesa es menor. De este modo, la relativamente alta presencia de ovejas del lote control que ovularon durante el experimento pudo deberse a cierta actividad sexual residual de los machos no tratados, aunque insuficiente para lograr la plena expresión de celos en estos animales.

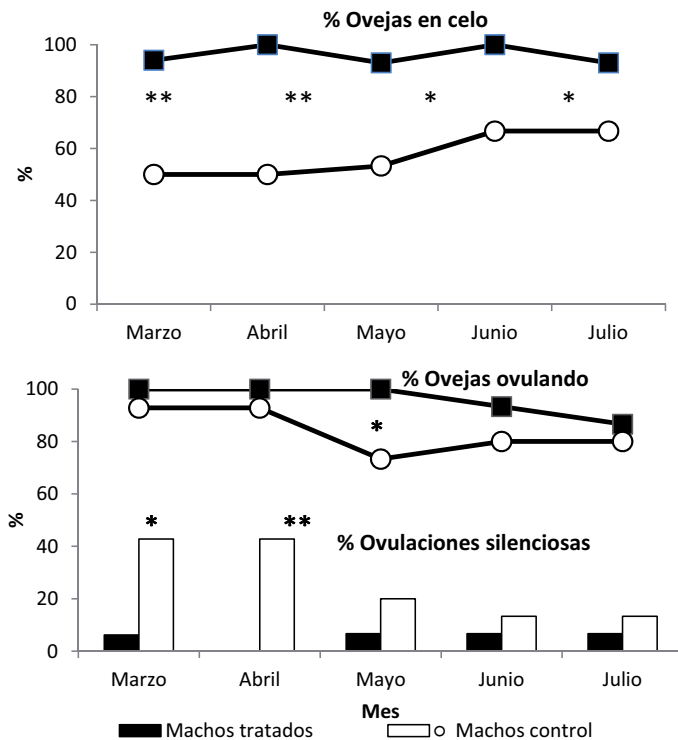
En conclusión, la presencia de machos activados mediante fotoperiodo artificial y melatonina en primavera es capaz de provocar un aumento de la actividad sexual de las ovejas, en lo que a la manifestación de celos se refiere.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Delgadillo, J. A., et al. 2002. *J. Anim. Sci.* 80, 2780-2786
- Delgadillo, J.A. et al. 2015. *Horm. Behav.* 69, 8-15
- Forcada, F. et al. 1992. *Small Rumin. Res.* 8, 313-324
- Forcada, F., Abecia, J.A. 2006. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 355-365
- Lindsay, D.R. 1996. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 1-12

Agradecimientos: Trabajo financiado por el Proyecto AGL2013-41200-P (Ministerio de Economía y Competitividad)

Figura 1. Porcentaje de ovejas en celo (gráfico superior), y porcentaje de ovejas ovulando (líneas, gráfico inferior) y porcentaje de ovulaciones silenciosas (barras, gráfico inferior) de ovejas Rasa Aragonesa mantenidas con “Machos Tratados” con dos meses de luz artificial (16 h de luz) e implantes de melatonina, o con “Machos Control”, sometidos a fotoperiodo natural (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).#



PERMANENT CONTACT WITH ARTIFICIAL-PHOTOPERIOD AND MELATONIN TREATED RAMS MODIFIES OVARIAN ACTIVITY OF RASA ARAGONESA EWES IN SPRING

ABSTRACT: The aim of this work was to study whether or not the presence of previously sexually stimulated males by melatonin and artificial photoperiod may reduce seasonal anestrus in sheep, keeping their ovulatory activity in spring. Vastomized rams were exposed to 2 months of long days and 3 melatonin implants (treated rams, $n=8$), or remained under natural light conditions (control rams, $n=2$). Ewes were divided into two groups, and were kept in contact, in different houses, with the treated ($n=16$) or the control rams ($n=15$) from February to July. Oestrus was recorded every day through marks in the ewes' rumps from harnesses, and ovarian activity through weekly blood samples. Most of the ewes exposed to treated rams (14/16) presented oestrus during the studied period. The control group presented a higher percentage of silent ovulations than the treated group in March ($P < 0.05$) and April ($P < 0.01$). In conclusion, the presence of sexually activated rams by artificial photoperiod and melatonin in spring can lead to an increased oestrous activity of the ewes.

Keywords: ram, ewe, ovulation, contact

EFFECTO DE LA METEOROLOGÍA SOBRE LA FERTILIDAD TRAS INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE CABRAS DE RAZA PAYOYA EN PRIMAVERA

Arrébola, F., González-Casquet, O., Benítez, F., Palacios, C., Abecia, J.A.¹
IFAPA. Ctra. El Viso, km 15. 14270 Hinojosa DEL Duque, Córdoba. ¹alf@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La producción extensiva de ganado está íntimamente ligada al clima y a sus variaciones, estudiadas y medidas a través de la meteorología. Así, temperatura (T), humedad relativa (HR), radiación solar (RS) o precipitaciones en forma de lluvia (P) son potenciales estresores medioambientales, de modo que pueden afectar de manera negativa al bienestar de los animales y a su productividad (Gomes da Silva, 2006). En sistemas ultra extensivos australianos de ovino, ya se reconoce la necesidad de instalar sistemas de protección frente a la elevada RS de ese país y frente al frío viento invernal, instalando zonas de sombra y paravientos (Taylor et al., 2011). La exposición de ovejas a elevadas temperaturas afecta negativamente a las funciones biológicas, reflejándose en un descenso de sus producciones y de sus índices reproductivos (Marai et al., 2007). El efecto de las precipitaciones viene dado de manera indirecta, a través de una disminución de la cantidad de pastos disponibles por el ganado (Arrébola et al., 2009). Santolaria et al. (2014) observaron un efecto negativo de la T máxima antes de la inseminación artificial (IA) sobre la tasa de gestación durante los primeros meses de la época reproductiva en ovinos. Palacios y Abecia (2014) han demostrado que el porcentaje de partos tras IA en la raza Churra se ve afectada significativamente por las variables meteorológicas, siendo este efecto dependiente de la estación de año, de modo que algunos parámetros como la temperatura revierten sus efectos dependiendo de la estación.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el efecto de algunas variables meteorológicas registradas durante el día de la IA sobre la tasa de fertilidad en cabras de la raza Payoya, en primavera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 1.092 IA de 820 cabras de raza Payoya, pertenecientes a 10 ganaderías de la provincia de Cádiz (36°N) durante 4 años, inseminadas siguiendo los protocolos de Arrébola et al. (2014) durante los meses de marzo a mayo. Para el día de la IA se han recogido: T media, máxima y mínima (°C), HR (%) media, RS media (MJ/m²) y P total del día (mm). Con estos datos se ha calculado el Índice temperatura-humedad (THI) (West, 1994): $THI = T + 0,36 * HR + 41,2$ y la Temperatura Efectiva (TE) (Yamamoto et al.; 1994) $ET = 0,24 T + 0,76 * RS$. Se realizó un diagnóstico de gestación 45 tras la IA, confirmado tras los partos.

La tasa de fertilidad se calculó como el porcentaje de cabras gestantes sobre el total de cabras inseminadas. Los datos ha sido analizados como un estudio de caso-control (caso: no gestación tras la IA; control: gestación tras la IA). En primer lugar, se compararon mediante anova los valores meteorológicos alcanzados el día de la IA en función del resultado alcanzado, así como las diferencias entre los tres meses estudiados. Posteriormente se realizó un análisis multivariante utilizando un modelo de regresión logística binaria para estimar el riesgo de no quedar gestante en comparación con sí hacerlo, frente a la exposición a los parámetros meteorológicos estudiados. Éstos fueron convertidos en variables categóricas utilizando el valor de la mediana de cada variable continua meteorológica como el punto de corte (0, debajo de la mediana; 1, encima de la mediana). Se dividió el conjunto de datos en dos clases para cada variable meteorológica. Todas las variables con un valor de $p < 0,05$ fueron incluidas en el modelo, calculándose los *odd ratios* (OR) para cada variable. En un tercer paso, se dividieron los parámetros meteorológicos en deciles y se comparó mediante la prueba de chi cuadrado la fertilidad alcanzada para los deciles extremos (1 y 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fertilidad global de la experiencia fue de un 58%, dándose los mayores porcentajes en abril (63%), seguido de marzo (56%) y mayo (54%) ($P < 0,05$). Las inseminaciones resultantes en parto se realizaron con temperaturas significativamente ($P < 0,0001$) más elevadas que las no exitosas (Tabla 1). Los OR calculados revelaron que la T mínima registrada el día de la IA tuvo un efecto significativo sobre la fertilidad ($OR = 1,264$; intervalo de confianza al 95%: 0,990-1,614), de modo que se encontraron diferencias significativas para este parámetro entre los dos grupos de inseminaciones planteados para esa variable. Así, el grupo de IA realizadas a T por debajo de la mediana de T mínima ($7,15^{\circ}C$) mostró un 56% de fertilidad, frente al 62% del grupo de IA con T mínima por encima de la mediana ($10,93^{\circ}C$) ($P < 0,05$). El OR alcanzado indica que un aumento de un grado de la T mínima del día de la IA incrementa la posibilidad de gestación en un 26,4%.

Tabla 1. Valores meteorológicos medios ($\pm S.E.M.$) alcanzados el día de la inseminación artificial de cabras de raza Payoya en función del éxito de la inseminación. (a,b $P < 0,0001$)

Parto	NO	SI
N	454	638
T Media ($^{\circ}C$)	16,91 \pm 0,12 ^a	17,00 \pm 0,10 ^b
T Máxima ($^{\circ}C$)	25,13 \pm 0,21 ^a	25,22 \pm 0,17 ^b
T Mínima ($^{\circ}C$)	8,67 \pm 0,10 ^a	8,84 \pm 0,103 ^b
T Efectiva	22,70 \pm 0,27 ^a	22,91 \pm 0,20 ^b
HR (%)	61,28 \pm 0,68 ^a	60,83 \pm 0,57 ^b
THI	80,17 \pm 0,19 ^a	80,11 \pm 0,17 ^b
Radiación Solar (MJ/m ²)	24,52 \pm 0,33 ^a	24,78 \pm 0,25 ^b
Precipitación (mm)	3,90 \pm 1,65	2,55 \pm 0,44

En cuanto a la comparación de los deciles extremos de cada uno de los parámetros meteorológicos estudiados (Tabla 2), las diferencias entre ambos para la fertilidad fue altamente significativa ($P < 0,0001$) para las temperaturas media, máxima y mínima, dándose fertilidades un 12-14% más elevadas en condiciones de mayores temperaturas el día de la IA. Para el meteoro P, las diferencias se observaron a favor del decil inferior ($P < 0,05$), en condiciones de ausencia de lluvia, con un 10% más de fertilidad que el decil superior.

En un trabajo previo de nuestro grupo se observó que un numeroso grupo de factores extrínsecos a la explotación modifican de manera significativa la fertilidad de las cabras Payoya tras la IA (edad, tamaño de grupo, tipo de IA, número previo de partos y producción lechera) (Arrébola et al., 2014). Los factores intrínsecos como el año, el mes de IA y la propia ganadería también afectaron significativamente a la fertilidad. El factor ganadería ha sido descrito previamente como uno de los que mayor efecto muestran sobre la fertilidad tras la IA en las especies ovina y caprina, como un reflejo de su diversidad en lo referente a su propio manejo y a todos sus inputs productivos (nutrición, interacciones con humanos, las capacidades del ganadero, el estrés, el calendario reproductivo, la raza, etc). Quedaría por determinar si estos factores están asociados a sus propias variables meteorológicas, o además de éstas, otras condiciones ligadas a los tres factores son responsables de sus efectos.

Ya que la temperatura se ha revelado como factor que modifica la fertilidad tras IA de cabras de raza Payoya en primavera, una previsión a medio plazo de bajas temperaturas en las condiciones donde se desenvuelven estas ganaderías podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de planificar las fechas de IA.

Tabla 2. Fertilidad alcanzada en los deciles 1 y 10 de cada uno de los parámetros meteorológicos estudiados, y sus valores medios (\pm S.E.M.)

Factor	Decil 1 (n=109)	Decil 10 (n=109)	P
T Media °C	56% 12,87 \pm 0,06	68% 21,04 \pm 0,09	P<0.0001
T Máxima °C	54% 17,05 \pm 0,20	68% 31,31 \pm 0,12	P<0.0001
T Mínima °C	58% 5,75 \pm 0,06	66% 12,92 \pm 0.02	P<0.0001
T Efectiva	56% 11,83 \pm 0,44	56% 28,00 \pm 0,02	ns
HR %	58% 40,16 \pm 0,39	49% 84,81 \pm 0,36	ns
THI	65% 73,22 \pm 0,22	64% 87,09 \pm 0,66	ns
Radiación Solar MJ/m ²	56% 11,07 \pm 0,54	53% 31,75 \pm 0,06	ns
Precipitación mm	59% 0,00 \pm 0,00	49% 37,33 \pm 2,61	P<0.05

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrebola, F.A., et al. 2009. NZ Vet. J. 57: 141-145
- Arrebola, F., et al. 2014. Anim. Prod. Sci. 54: 356–362
- Da Silva, R.G. 2006. http://www.agrometeorology.org/files-folder/repository/gamp_chap_11.pdf.
- Marai, I.F.M., et al. 2007. Small Rumin Res 71: 1–12
- Palacios, C., Abecia, J.A. 2014. Int. J. Biometeorol. DOI 10.1007/s00484-014-0872-y
- Santolaria, P., et al. 2014. Int J Biometeorol DOI 10.1007/s00484-013-0770-8
- Taylor DB, et al. 2011. Anim. Prod. Sci. 51: 724–737
- West, J.W. 1994. J. Dairy Sci. 77: 2091–2102
- Yamamoto, S, et al. 1994. Aust. J. Agric. Res. 45: 1741–1749

EFFECT OF METEOROLOGY ON FERTILITY AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION IN PAYOYA GOATS IN SPRING

ABSTRACT: A total number of 1092 artificial inseminations (AI) from 820 Payoya goats have been controlled during 4 years, in 10 farms (36°N). Mean, maximum and minimum ambient temperatures (T), temperature amplitude (TA), mean relative humidity (RH), mean solar radiation (SR) and total rainfall of each insemination day were recorded. Temperature-humidity index (THI) and effective temperature (ET) have been calculated. A binary logistic regression model to estimate the risk of not getting pregnant compared to getting pregnant, through the odds ratio (OR), was performed. Overall fertility was 58%. The OR revealed that minimum T had a significant effect on fertility (OR = 1.264), indicating that an increase of one degree of the minimum T the day of AI increases the chance of pregnancy by 26.4%. Fertility rate observed for the lowest decile of each meteorological factor revealed that the higher mean, maximum or minimum T reached the day of AI, the higher fertility rate. Thus, a forecast focused on temperatures could be useful when planning dates of AI in this particular breed and localization.

Keywords: goats, meteorology, fertility, insemination

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO INTRAVAGINAL PARA LA RECOGIDA DE SEMEN EN GANADO OVINO

Mozo¹, R.; Alabart, J.L.; Rivas, E.; Echegoyen, E.; Navarro, M.A.; Folch, J.
¹Unidad de Tecnología en Producción Animal. CITA. Avda. Montaña 930. 50059. Zaragoza. rmozo@cita-aragon.es

INTRODUCCIÓN

La evaluación seminal es de gran importancia para caracterizar la aptitud reproductiva de los moruecos. Los dos métodos más utilizados para la recogida de semen en la especie ovina son la vagina artificial (VA) y la electroeyaculación (EE). La utilización de la VA presenta una pobre eficacia para la recogida de semen de machos que no han sido entrenados (Wulster-Radcliffe et al., 2001), y en el caso de la EE, se han observado casos de alteración del eyaculado (Marco-Jiménez et al., 2008; Jiménez-Rabadán et al., 2012) o inconvenientes relacionados con el bienestar de los animales (Palmer, 2005; Whitlock et al., 2012). Esto ha llevado a su prohibición sin anestesia en algunos países de la UE, como Suecia (Eriksson et al., 2012). Como alternativa a la VA y la EE, se han desarrollado dispositivos para la recogida de semen aplicables en las condiciones de una cubrición natural, como los dispositivos intravaginales utilizados en bovinos (Barth et al., 2004; Cruz et al., 2011) u ovinos (Synnott et al., 1981; Wulster-Radcliffe et al., 2001). Estos métodos no necesitan de un entrenamiento de los machos ni la utilización de fármacos. Sin embargo, los dispositivos existentes son poco eficaces en moruecos de monta natural, ya sea por la inhibición de los machos o porque los machos consiguen eyacular externamente, o son inoperables en los rebaños comerciales. El objetivo de este estudio fue desarrollar un dispositivo intravaginal (DIV) de uso sencillo, que sea barato e inocuo, que permita la obtención de eyaculados para evaluar la calidad seminal de los moruecos utilizados en ganaderías en monta natural.

MATERIAL Y MÉTODOS

El dispositivo intravaginal utilizado en el presente estudio fue diseñado por nuestro equipo de investigación y fabricado en silicona (Figura 1), con el objetivo de evitar materiales potencialmente lesivos, como varillas metálicas, hilos de nailon, vidrios, etc. Como medio de recogida desechable se utilizó un preservativo acoplado al DIV.

Para evaluar el efecto de los DIV sobre el comportamiento de los machos se emplearon 15 machos no entrenados con la VA, que se pusieron en contacto con una oveja en celo hasta el momento en el que el macho realizó la cubrición (máximo de 10 minutos). El comportamiento de los machos durante la cubrición cuando fueron expuestos a una oveja con el DIV se comparó con el mostrado en monta natural (MN). Para cada macho se registró: el número de montas antes de la cubrición y el tiempo hasta la cubrición (TC). Además, se registró la eficacia del DIV para la recogida de eyaculados (% de machos que eyaculan) en función del total de machos evaluados (eficacia total: ET), y en función del número de machos que mostraron actividad sexual (eficacia relativa: ER). Los datos fueron tomados por filmación, sin presencia de observadores.

El efecto del DIV sobre la calidad seminal se evaluó en dos machos donantes entrenados con la vagina artificial comparando la calidad de cuatro eyaculados obtenidos alternativamente con el DIV y con la VA (n=8). Para cada eyaculado se registró el volumen, el porcentaje de espermatozoides móviles (100x), la calidad de movimiento (100x) y el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro (400x) a las 0, 1 y 3 h de incubación a 37°C en un baño María. Para la evaluación seminal se utilizó un microscopio de contraste de fase.

El estudio estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (SYSTAT Software Inc.). La comparación entre el número de montas, el tiempo hasta la cubrición y la duración de la cubrición de cada macho se realizó mediante un *test de Wilcoxon* para muestras pareadas. La efectividad para recoger los eyaculados (total o parcial) en función del método utilizado (DIV o MN) se estudió mediante una prueba de *Chi-cuadrado*. El efecto del método de recogida sobre la calidad seminal se analizó con un *Modelo Lineal General*. Se consideró que había diferencias significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la colocación del DIV o el tiempo que portaban los dispositivos, las ovejas exhibieron el comportamiento normal de una oveja en celo. La utilización de los dispositivos no generó ningún tipo de lesión en los machos o las ovejas. Tampoco tuvo ningún efecto significativo sobre el comportamiento de los machos en comparación con la MN (Tabla 1), aunque hubo diferencias individuales importantes. El tiempo transcurrido desde la colocación del DIV hasta la recogida del eyaculado fue de poco más de un minuto, siendo muy inferior al registrado en otros estudios realizados en la especie ovina con otro tipo de dispositivos vaginales (Synnott et al., 1981; Wulster-Radcliffe et al., 2001). Además, el dispositivo presentó una gran eficacia para la recogida de eyaculados (Tabla 1). Así, la utilización del DIV permitió recoger semen del 80% de los machos evaluados (ET), que fue muy superior al observado por Wulster-Radcliffe et al. (2001) en ovinos, y del 100% de los machos que mostraron actividad sexual; similar al observado en otro estudio previo realizados en la especie ovina (Synnott et al., 1981) en los que se obtuvieron muy buenos resultados, pero con dispositivos inoperables en las ganaderías.

Finalmente, la utilización del dispositivo no afectó significativamente el volumen (DIV: $0,77 \pm 0,8$ vs. VA: $0,98 \pm 0,16$; $P > 0,05$), el porcentaje de espermatozoides móviles (DIV: $73,8 \pm 5,2$ vs. VA: $70,0 \pm 8,9$; $P > 0,05$), el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro (DIV: $63,0 \pm 16,8$ vs. VA: $61,5 \pm 15,5$; $P > 0,05$) o la calidad de movimiento (DIV: $3,1 \pm 0,2$ vs. VA: $3,3 \pm 0,3$; $P > 0,05$) después de 3 horas de incubación.

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que el dispositivo desarrollado en el presente estudio es inocuo y fácil de utilizar, no afecta al comportamiento de los machos utilizados para monta natural, ni las hembras en las que se coloca el DIV, ni a la calidad seminal de los eyaculados recogidos. El DIV permitió la recogida de eyaculados de todos los machos que mostraron actividad sexual de una forma muy rápida. Estos resultados indican que el DIV es un método potencialmente aplicable en las ganaderías para la evaluación seminal de los machos, y que podría ser empleado también para la recogida de semen y su posterior utilización en biotecnología con fines científicos, de transferencia o de conservación de material genético. Además, es probable que pequeñas modificaciones del tamaño del dispositivo permitan su utilización en otras especies tanto domésticas como silvestres, lo que podría facilitar los protocolos de recogida de semen en determinados programas de conservación y mejora genética.

Tabla 1. Número de montas realizado por cada macho antes de la cubrición, el tiempo hasta la cubrición y eficacia para la recogida de eyaculados en función de las condiciones de cubrición (Control y DIV).

Método	Machos	ET	Machos activos*	ER	NM	TC (min)
	n	(%)	n	(%)	Media \pm EEM	Media \pm EEM
Control	15	80,0	12	100,0	$0,2 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
DIV	15	80,0	12	100,0	$0,8 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,6$

* Solo se incluyen aquellos individuos que mostraron actividad sexual. Machos sexualmente activos, son los machos que realizan una monta dentro de los 10 minutos.

DIV: dispositivo intravaginal; ET: efectividad total; ER: efectividad relativa; NM: número de montas previas a la cubrición; TC: tiempo invertido por el macho hasta que realiza una cubrición.

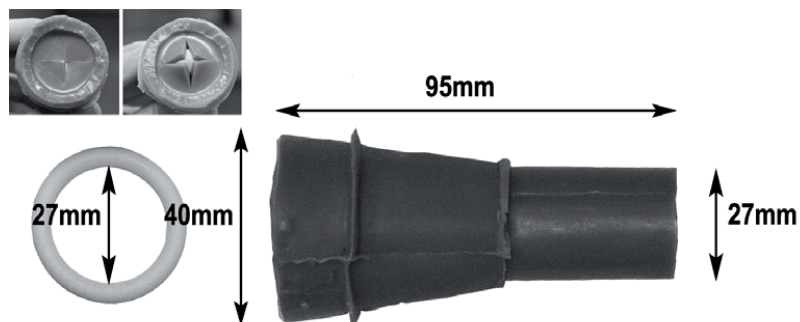


Figura 1. Diseño definitivo del DIV empleado en el experimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barth, A.D., Arteaga, A.A., Brito, L.F.C., Palmer, C.W., 2004. Anim Reprod Sci 84, 315-325
- Cruz, F.B., Lohn, L., Marinho, L.S.R., Mezzalira, J.C., Neto, S.G., Martins, L.T., Vieira, A.D., Barth, A., Mezzalira, A., 2011. Anim Reprod Sci 126, 157-161
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., del Olmo, E., Pérez-Guzmán, M.D., Bisbal, A., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J., Soler, A.J., 2012. Anim Reprod Sci 132, 88-95
- Marco-Jiménez, F., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P., 2008. Reprod Domest Anim 43, 403-408
- Palmer, C.W., 2005. Theriogenology 64, 469-479
- Synnott, A.L., Fulkerson, W.J., Lindsay, D.R., 1981. J Reprod Fertil 61, 355-361
- Whitlock, B.K., Coffman, E.A., Coetzee, J.F., Daniel, J.A., 2012. Theriogenology 78, 737-746
- Wulster-Radcliffe, M.C., Williams, M.A., Stellflug, J.N., Lewis, G.S., 2001. J Anim Sci 79, 2964-2967.

DEVELOPMENT OF AN INTRA-VAGINAL DEVICE FOR SEMEN COLLECTION IN SHEEP

ABSTRACT: A new intravaginal device (IVD) was developed for semen collection in commercial farms. Two experiments were conducted to determine whether the IVD affected either the breeding behaviour during mating or the quality of the semen collected. In experiment 1, fifteen artificial vagina (AV) untrained rams were used for assessing the effect of IVD on breeding behaviour compared to natural mating. The results showed that the IVD did not affect ram breeding behaviour during mating. Rams collected in relation to rams evaluated was 80% and rams collected in relation to rams performing mating was 100%. The mean time required for semen collection was 1.3 ± 0.6 min. In experiment 2, two rams trained for artificial vagina were used for assessing semen quality of ejaculates collected with IVD or AV ($n=8$). The quality of semen samples was assessed after incubation at 37°C in water bath for 0, 1 and 3 hours. Volume, percentage of motile spermatozoa, movement quality, and percentage of spermatozoa with normal apical ridge (NAR) were determined. After three hours of incubation, there were not found significant differences in the semen quality parameters between samples collected with AV or IVD. In conclusion, the IVD described here is a suitable method that allows semen collection of a high percentage of AV-untrained rams in a short period of time.

Keywords: semen collection, semen evaluation, ram, breeding soundness evaluation

RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA Y CALIDAD SEMINAL CON EL GRADO DE PARASITACIÓN POR PIOJOS (*MENACANTHUS STRAMINEUS*) EN RAZAS AUTÓCTONAS DE GALLINAS ESPAÑOLAS

Castano, C., Toledano-Díaz, A. Coloma, M. A., López-Sebastián, A. Campo, J. L. y Santiago-Moreno J.

Departamento de Reproducción Animal, INIA. Avda. Puerta de Hierro Km 5.9, 28040 Madrid.
cristina.castano@inia.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha aumentado el interés de una producción ganadera de calidad alternativa a la industrial. Esto ha estimulado la recuperación de razas autóctonas adaptadas a sistemas de producción al aire libre y con una mayor resistencia a enfermedades. Con el objeto de preservar las principales razas autóctonas de gallinas se ha creado un banco de semen congelado como complemento al programa de conservación del INIA de razas españolas. Para dicho banco, se han establecido criterios de selección de gallos donantes de semen, teniendo en cuenta los caracteres sexuales secundarios, las influencias medioambientales (fotoperiodo y temperatura) que afectan a parámetros seminales, fundamentalmente al volumen y concentración (Santiago-Moreno et al. 2009a,b), así como los efectos en la reproducción de factores de índole sanitario, como las parasitosis. *Menacanthus stramineus* es un parásito habitual en los gallineros, generalmente asintomático, aunque una elevada parasitosis puede afectar a la calidad del plumaje dado el carácter malófago del mismo. Se ha descrito que las parasitosis pueden tener un coste reproductivo, pudiendo afectar en los machos, a la calidad seminal en diferentes especies estudiadas (Sekoni 1992; Masvaer et al. 2004) mediante inducción de procesos de estrés (Tmkiratiwong et al. 2006), o alteraciones inmunológicas (como un ataque inmunológico en los testículos) que afectarían a la espermatogénesis (Skau y Folstad, 2005). De forma alternativa a esta relación parásito / coste reproductivo del hospedador, se ha propuesto la hipótesis del hándicap de la inmunocompetencia según la cual los machos con mejor calidad de los ornamentos (caracteres sexuales secundarios) y altos niveles de testosterona, tendrían una mayor predisposición a las parasitosis, mediada por el efecto inmunosupresor de este esteroide gonadal (Folstad y Karter, 1992; Santiago-Moreno et al., 2010). Con el objeto de testar esta hipótesis, en el presente trabajo se evaluó la relación de las concentraciones plasmáticas de testosterona y la calidad seminal en gallos de tres razas autóctonas españolas con diferentes grados de parasitación por *Menacanthus stramineus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 gallos (10 por raza) de 1 año de edad, de las razas autóctonas españolas: Espanola Cara Blanca, Andaluza Azul y Castellana Negra, pertenecientes al Programa de Conservación de Gallinas del INIA. Los gallos de cada raza se mantenían en jaulas de 12 m², en condiciones climáticas y de fotoperiodo natural. La alimentación consistía en una dieta comercial que contenía 16% proteína cruda, 2700 kcal energía metabolizable/kg, 3,5% Ca y 0,5% P disponible. Durante un periodo de 3 meses (abril a junio), coincidiendo con el periodo de mayor producción seminal, se recogieron muestras de semen (Burrows y Quinn, 1937) y se hizo un recuento del número de piojos *Menacanthus stramineus* en un área de 4 cm² alrededor de la cloaca. Se establecieron cuatro rangos de calidad seminal en función del volumen y aspecto: 0 cuando no había semen, 1 volumen menor de 0,2 ml y aspecto transparente, 2 volumen igual a 0,2 ml y aspecto grisáceo, y 3 volumen mayor de 0,2 ml y aspecto blanco lechoso. Se recogieron muestras de sangre una vez al mes de la vena braquial para la determinación de las concentraciones plasmáticas de testosterona mediante radioinmunoanálisis (Fargallo et al., 2007). La influencia de la raza en la calidad seminal, grado de parasitosis y niveles plasmáticos de testosterona se analizó mediante ANOVA. La correlación entre el número de parásitos, calidad seminal y concentraciones plasmáticas de testosterona se realizó mediante una correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han observado diferencias significativas entre razas en la calidad seminal ($P < 0,01$) y concentraciones plasmáticas de testosterona ($P < 0,05$). No hubo diferencias entre razas en el número de parásitos. Se apreció una correlación inversa entre el número de parásitos y calidad del semen ($r^2 = 0,02$ $P < 0,001$) (Figura 2), pero no había ninguna correlación entre el número de parásitos y las concentraciones plasmáticas de testosterona. Estos resultados sugieren que el grado de la parasitación por piojos corporales no viene influenciado de forma directa por los niveles de testosterona, por lo que no apoyaría la hipótesis del hándicap de la inmunocompetencia apuntada en otras especies (Folstad y Karter, 1992; Santiago-Moreno et al., 2010). El hecho que la presencia de un mayor número de parásitos afecte la calidad seminal pone de manifiesto el coste reproductivo determinado por la presencia de un elevado número de piojos, independientemente del estatus endocrino, reflejado en una alteración de la calidad seminal, y por tanto de la fertilidad del gallo. Los resultados parecen apuntar que el estrés producido sobre animal (por ejemplo a través del prurito) podría inducir unos niveles elevados de cortisol que afectarían su capacidad espermatogénica (Akibami y Mann, 1996). En conclusión, los resultados muestran que no hay una predisposición racial en el grado de parasitosis por piojos, siendo la calidad seminal inversamente proporcional al número de piojos, independientemente de los niveles de testosterona en plasma sanguíneo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aickin, M., and Gensler, H. (1996). *Am J. Publish Health* 86, 726-728
- Burrows, W. H., and J. P. Quinn. 1937. *Poult. Sci.* 16:19-24
- Fargallo, J. A., J. Martínez-Padilla, A. Toledano-Díaz, J. Santiago-Moreno, and J. A. Dávila. 2007. *J. Anim. Ecol.* 76:201-209.
- Folstad I, Karter AJ (1992). *Am Nat* 139:603-622
- Masvaer M, Liljedal S, Folstad I (2004). *Proc R Soc Lond B (Suppl)* 271:S40-S42
- Norris K, Anwar M, Read AF (1994). *J Anim Ecol* 63:601-610
- Santiago-Moreno J., Luzón, M., Coloma M.A., Pulido-Pastor A., Gómez-Guillamon F., Salas-Vega R., Toledano-Díaz, A., Lopez-Sebastian A. (2010). *Eur J Wildl Res* (2010) 56:605-611.
- Santiago-Moreno, J., A. Lopez-Sebastian, C. Castano, M. A. Coloma, A. Gomez-Brunet, M. T. Prieto, and J. L. Campo. (2009a). *Span. J. Agric. Res.* 7:555-562
- Santiago-Moreno, J., C. Castano, M. A. Coloma, A. Gomez-Brunet, A. Toledano-Díaz, A. Lopez-Sebastian, and J. L. Campo. (2009b). *Poult. Sci.* 88:2661-2669.
- Sekoni VO (1992). *Brit Vet J* 148:501-506
- Skau PA, Folstad I (2005). *Behav Ecol* 16:410-416
- Tumkiratiwong P, Sukkachart H, Buapuan T, Tungtrongchitr R, Tungtrongchitr A (2006). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37:250-256

Agradecimientos: Trabajo financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) mediante el Proyecto RZ2012-00013-C02.

Tabla 1. Medias de los diferentes parámetros. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

RAZA	Nº MS	CALIDAD SEMEN	TESTOSTERONA (ng/ml)
CN	7,1 ± 1,0a	0,9 ± 0,1b	2,2 ± 0,1b
CB	5,9 ± 1,0a	1,3 ± 0,1a	4,1 ± 0,2a
AA	6,3 ± 0,8a	0,6 ± 0,1c	4,6 ± 0,3a

Espanola Cara Blanca (CB), Andaluza Azul (AA) y Castellana Negra (CN)
Menacanthus stramineus (MS)

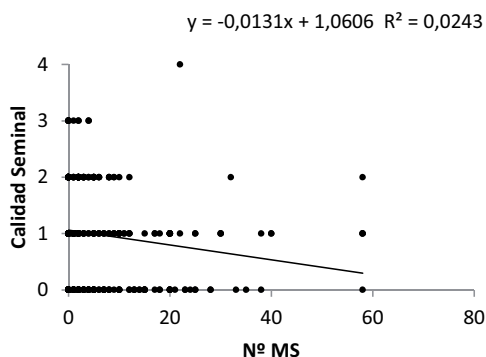


Figura 1. Correlación entre el número de parásitos *Menacanthus stramineus* (MS) en la zona cloacal y la calidad seminal.

RELATIONSHIP BETWEEN PLASMATIC TESTOSTERONE AND SPERM QUALITY WITH PARASITISM LEVELS BY LICE (*MENACANTHUS STRAMINEUS*) IN AUTHOCTONOUS SPANISH CHICKEN BREEDS

ABSTRACT Parasitism alters sperm quality by inducing stress processes or immunological disorders, which make affect spermatogenesis. In order to evaluate the hypothesis about the immunosuppressive effect of gonadal steroids (males with high testosterone levels would have increased Parasitism susceptibility), our study was conducted assessing testosterone plasmatic concentration and sperm quality in three Spanish chicken (Blue Andaluza, White-faced Spanish, Black Castellana) with different parasitism levels by *Menacanthus stramineus*. In our results, significant differences in sperm quality ($P < 0.01$) and plasmatic testosterone concentrations ($P < 0.05$) between breeds were observed. Negative correlation between parasitism levels and sperm quality was found ($P < 0.001$). In conclusion, high parasitism level by lice determines a reproductive cost in males, manifested in decrease in semen quality.

Keywords: Spanish chicken breeds, *Menacanthus stramineus*, sperm quality, plasmatic testosterone

DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS ENTRE LA PERDIZ ROJA PURA (*Alectoris rufa*) Y CON INTROGRESIÓN GENÉTICA (*Alectoris rufa* x *Alectoris chukar*) DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA

Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Torres, O., Gil M.G., Dávila, S.G., Velázquez, R., Campo, J.L., Estesó, M.C., López-Sebastián, A., Santiago-Moreno, J.
Dpto. Reproducción Animal, INIA. Avd. Puerta de Hierro s/n. Km 5,9. 28040 Madrid. España
España. toledano@inia.es

INTRODUCCIÓN

La cría de la perdiz roja en granjas ha tenido un fuerte desarrollo para dar respuesta a la gran demanda cinegética de esta especie. El aumento de la cría y suelta de perdices (de 3 a 4 millones de perdices/año; Sánchez et al., 2009) ha consolidado una producción cinegética cada vez más industrializada (González-Redondo et al., 2010). Una de las prácticas para lograr esta intensificación en la producción ha sido la hibridación de la especie autóctona con la perdiz chukar (*Alectoris chukar*), y en menor medida con la perdiz griega (*Alectoris graeca*), con el fin de incrementar la rentabilidad de las explotaciones. Se cree que el 63 % de las perdices liberadas, y posiblemente un 45% de la población silvestre, tienen introgresión genética con la perdiz chukar. Algunas de las consecuencias son la alteración de los parámetros biológicos, como la disminución a la respuesta de huida y el comportamiento antipredatorio (Zilieti et al., 1993) o la alteración en la actividad reproductiva, factores que puede repercutir negativamente en la conservación de nuestra especie autóctona. En estudios previos se ha observado como la introgresión genética altera la producción y calidad seminal en la perdiz roja (Santiago-Moreno et al., 2015). En el presente trabajo se analizaron las variaciones en los principales parámetros reproductivos en dos grupos de perdiz roja, puro y con introgresión con chukar, mantenidos en las mismas condiciones de cría, durante el primer año de vida.

MATERIAL Y METODOS

El grupo de perdices autóctonas puras fue cedido por la Estación de Referencia de la Perdiz Roja (Lugar Nuevo, Jaén), perteneciente a la Junta de Andalucía. Las perdices con introgresión genética con chukar fueron adquiridas en una granja comercial que tenía una introgresión genética mayor del 35%, según el análisis genético oficial. Todos los animales fueron adquiridos con 4 meses de edad y mantenidos en cautividad en la Estación Avícola Experimental del INIA "El Encin" (Alcalá de Henares, Madrid, 40°31'N) en jaulones de cría de 10 compartimentos (20 cm x 1 m por compartimento), bajo condiciones de fotoperiodo y temperatura natural y alimentados ad libitum.

Se desarrollaron dos experimentos:

Experimento 1. El objetivo de este experimento fue evaluar los parámetros relacionados con la puesta y la fertilidad. Se utilizaron 20 parejas de perdices puras y 20 parejas con introgresión genética. Diariamente, desde 1 de enero y hasta el 30 de septiembre (cuando las hembras habían dejado de poner huevos) se retiraban, identificaban y registraban todos los huevos puestos. Posteriormente se desechaban los huevos rotos o sucios y el resto se conservaban en una cámara de almacenaje (10°-15°C) hasta su incubación. El periodo de incubación fue de 20 días (37°C; 55% humedad relativa). El día 20 se evaluaba la fertilidad por ovoscopio. Los huevos con embrión desarrollado eran trasladados a una nacedora (37°C y 75% de humedad) durante 5 días. Se registró el número y la identificación de los huevos eclosionados y no eclosionados.

Experimento 2. El objetivo fue evaluar el inicio de la pubertad en los machos puros y con introgresión, mediante análisis de la actividad espermatogénica y los cambios endocrinos de testosterona. Se utilizaron 20 machos de ambos grupos. Desde el 1 de enero y hasta el 30 de septiembre y quincenalmente, se procedió a la toma de muestras seminales mediante el método de masaje dorsal descrito por Burrows y Quinn (1937); las muestras se diluyeron 1:1 (vol:vol) a temperatura ambiente con medio de conservación Lake-Ravie y almacenadas a 5°C durante 45 min hasta el análisis para evaluar la presencia o no de espermatozoides. También se recogió una muestra de sangre (1 ml) para la determinación de las

concentraciones plasmáticas de testosterona por RIA. Los porcentajes de fertilidad y incubabilidad fueron analizados mediante Chi-Cuadrado. La duración de la puesta y las concentraciones de testosterona se analizaron mediante t-Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el experimento 1 se realizaron un total de 8 incubaciones. El periodo de puesta varió entre grupos. Como se observa en la Tabla 1, la duración media de la puesta fue mayor ($p < 0,001$) en el grupo de perdices híbridas, al iniciar antes y finalizar después la puesta con respecto al grupo de perdices puras. Este periodo de puesta coincide con los registrado en otras granjas comerciales de perdices (Gaudioso et al., 2002; Mourao et al., 2010). El porcentaje de fertilidad ($p < 0,05$) y incubabilidad fue también mayor entre las perdices híbridas, aunque estos porcentajes son algo menores que los registrados por Mourao et al. (2010). Solamente un 5% de las parejas de perdices con introgresión genética no pusieron huevos frente a un 50% en el grupo de parejas puras.

Los niveles de testosterona en sangre muestran un perfil estacional de secreción, con un máximo de concentración en abril en ambos grupos (Figura 1), similares a los registrados por Santiago-Moreno et al. (2015). El aumento de los niveles de concentración en sangre viene precedido al aumento en el porcentaje de machos que responden al masaje y presentan espermatozoides en el eyaculado. En el grupo de perdices híbridas, en enero ya existe respuesta y presencia de espermatozoides. En el grupo de perdices puras, no es hasta marzo cuando muestran respuesta. Los resultados muestran que el inicio de la pubertad es más precoz (casi dos meses) en los machos híbridos con respecto a los puros. La duración del periodo de actividad sexual en las perdices híbridas se prolonga hasta casi dos meses más que en los puros. Nuestros resultados también muestran como la actividad sexual del macho precede a la actividad ovulatoria de la hembra. Como podemos observar en la Figura 2, el incremento de concentración de testosterona se inicia unos dos meses antes del inicio de la puesta. El incremento de los niveles de testosterona podría estimular la competición entre machos por el establecimiento de parejas que suele ocurrir uno o dos meses antes del la puesta (Fraissinet et al., 1987). En conclusión nuestros resultados muestran que ya en el primer año de vida, la introgresión genética altera los parámetros reproductivos en la perdiz roja, tanto en la hembra como en el macho, incrementado la precocidad del inicio de la pubertad en el macho, y el número de huevos y el periodo total de puesta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Burrows WH y Quinn JP. 1937. Poult. Sci. 16: 19-24. • Fraissinet et al., 1987. Gen. Comp. Endorc. 68:28-32. • Gaudioso et al., 2002. Poult. Sci. 81: 169-172. • González-Redondo et al., 2010. J. Agric. Res. 8(3): 624-633. • Lake, P.E. y Ravie, O. 1984. Poult. Sci. 25:145-150 • Mourao et al., 2010. Poult. Sci. 89: 2494-2498. • Sánchez et al. 2009 ITEA. Vol. 105(3): 169-183. • Santiago-Moreno et al., 2015. Poult Sci 94:80-87. • Zilleti et al., 1993. Suppl. Ric. Biol. Selvaggina XXI: 661-667.

Tabla 1: Parámetros reproductivos relacionados con la puesta.

	Grupo Híbridos	Grupo Puros
Inicio de la puesta	5 abril \pm 2 días ^a	19 mayo \pm 3 días ^b
Fin de la puesta	2 agosto \pm 5 días ^a	26 junio \pm 4 días ^b
Duración de la puesta	115 \pm 6 ^a días	34 \pm 4 ^b días
Nº total de Huevos puesto	1057	124
Media de huevos por pareja	53 \pm 4 ^a	10 \pm 3 ^b
% Fertilidad	68 \pm 7,2 ^a	58 \pm 4,4 ^b
% Incubabilidad	43 \pm 8,2 ^a	33 \pm 4,4 ^a

Letras distintas en una misma línea indican diferencia significativas ($p < 0,01$)

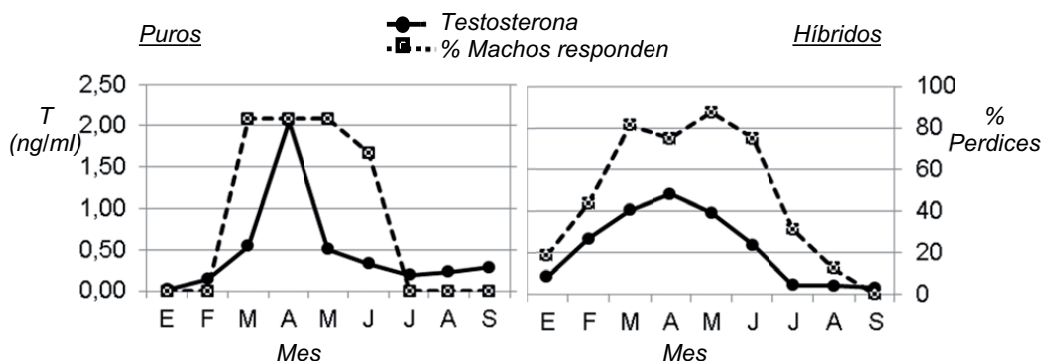


Figura 1. Media mensual de la concentración de testosterona frente al porcentaje de machos que responden al masaje y presentan espermatozoides en el eyaculado en perdices puras o híbridas

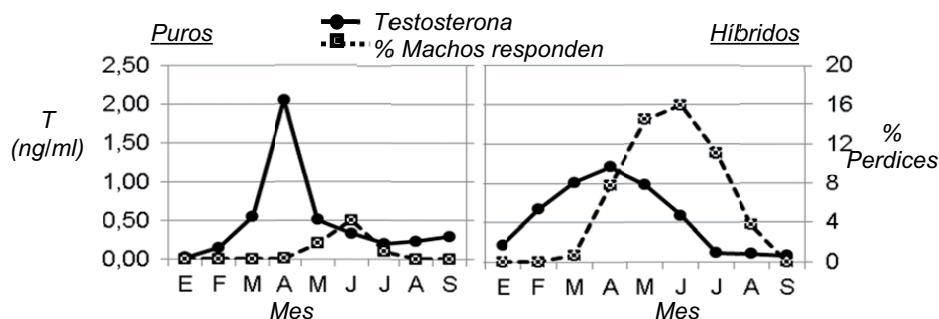


Figura 2. Patrón de secreción de testosterona y media mensual de puesta en los dos grupos de perdices.

REPRODUCTIVE DIFFERENCES BETWEEN RED-LEGGED PARTRIDGE PURE (ALECTORIS RUFA) AND WITH GENETIC INTROGRESSION (ALECTORIS RUFA X ALECTORIS CHUKAR) DURING THE FIRST YEAR OF LIFE

ABSTRACT: The aim of the present study was to determine the effects of genetic introgression with chukar partridges on seasonal reproductive patterns of red-legged partridge by comparing the sperm and plasma testosterone concentrations and the laying period of birds from pure red-legged and hybrid red-legged/chukar populations. The egg laying period was longer in hybrid group (115 ± 6 days vs 34 ± 4 days; $p < 0.001$). The percentage of fertility and hatchability were higher in hybrid than pure group (68 ± 7.2 vs 58 ± 4.4 and 43 ± 8 vs 33 ± 4.4). In the hybrid group, the sperm production began in January and ended in August, whereas in the pure group began in March and ended in June. The plasma testosterone concentration pattern followed a trend roughly parallel to the ejaculatory response. The increasing of testosterone levels occurred 2 months before than the onset of laying period in both groups. The results show that genetic introgression from chukar partridges modifies male red-legged partridge reproductive indicators during in the first year of age.

Keywords: genetic introgression, partridge, sperm, egg laying

EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE LA TRICOMONOSIS BOVINA EN ESPAÑA Y NUEVAS ALTERNATIVAS PARA SU CONTROL

Collantes-Fernández, E.¹, Rojo-Montejo, S., Sánchez-Sánchez, R., Navarro-Lozano, V., Moreno-Gonzalo, J., Román-Trufero, A., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M.

¹SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, U.C.M., Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid. Tel: +34913944095. esthercf@vet.ucm.es

INTRODUCCIÓN

La tricomonosis bovina (TB) es una enfermedad parasitaria de transmisión sexual que produce fallo reproductivo temprano. La importancia de esta enfermedad en España se ha puesto de manifiesto en la última década, siendo frecuente en los sistemas extensivos donde se utiliza la monta natural, causando importantes pérdidas económicas. En este sentido, en un estudio reciente realizado en ganaderías de la raza Asturiana de la Montaña, se ha estimado que los rebaños infectados presentaron un alargamiento del intervalo entre partos de 80 días y disminución del 17,2% en el número de terneros/año, suponiendo un 68,8% menos de ingresos anuales (Collantes-Fernández et al., 2014).

A nivel nacional, las medidas de control de esta enfermedad se basan únicamente en el diagnóstico y sacrificio de toros infectados. Sin embargo, su eficacia es variable debido a la presencia de una serie de factores de riesgo, como el uso de pastos comunales (Collantes-Fernández et al., 2014). Ante esta situación, la vacunación de las hembras podría ser una medida de control beneficiosa (Villarroel et al., 2004), pero en Europa no existe ninguna vacuna comercial disponible.

En el presente trabajo se analiza la evolución de la prevalencia de TB en el ganado vacuno de carne mantenido en condiciones extensivas en España entre los años 2008 y 2014. Así mismo, se presentan los avances realizados en el estudio de la seguridad y eficacia de diferentes formulaciones vacunales para el control de esta enfermedad en nuestro país.

MATERIAL Y MÉTODOS

Presencia y distribución espacio-temporal de TB en España

Se analizaron los resultados obtenidos de las muestras enviadas al laboratorio SALUVET para el diagnóstico de la TB. Estas muestras fueron enviadas entre los años 2008 y 2014 y procedían de sementales de granjas con fallo reproductivo temprano o como parte del programa sanitario para el control de enfermedades venéreas.

La detección de *Tritrichomonas foetus* se realizó a partir de muestras de esmegma preputial recogidas mediante el raspado de la mucosa del pene y prepuccio utilizando un raspador de cabezal plástico. Las técnicas utilizadas fueron el aislamiento del agente en medio de cultivo y la detección de sus ácidos nucleicos mediante técnicas de PCR (Mendoza-Ibarra et al., 2012).

Desarrollo de una vacuna inactivada para el control de la TB

Como aproximación para desarrollar vacunas frente a la TB, en este estudio se utilizaron diferentes formulaciones basadas en extractos proteicos del parásito enriquecidos en proteínas de membrana, con la finalidad de inducir una respuesta inmunitaria frente a este tipo de antígenos que pudiera evitar la adhesión de *T. foetus* al epitelio vaginal.

El diseño experimental se describe en la Tabla 1. Se evaluaron 2 vías de inoculación (subcutánea e intranasal) y 2 tipos de antígeno (A y B), combinados con una saponina como adyuvante. Uno de los grupos, se inmunizó utilizando una vacuna comercial (Trich Guard®, Boehringer Ingelheim). Se utilizaron 35 novillas vírgenes de la raza Holstein distribuidas al azar en los diferentes grupos, que fueron inmunizadas con dos dosis separadas 21 días. A los 21 días después de la última inmunización, las novillas fueron desafiadas por vía intravaginal con trofozoítos de *T. foetus* de un aislado heterólogo. De forma periódica hasta el día 112 post-desafío (p.d.) se recogió sangre y moco cérvico-vaginal (MCV).

La seguridad de dichas formulaciones se determinó mediante la observación diaria de los animales analizando el desarrollo de reacciones locales y sistémicas. La eficacia se determinó: i) analizando la duración de la infección mediante cultivo del parásito a partir del MCV y ii) evaluando los niveles de anticuerpos sistémicos (IgG) y genitales (IgA) por la técnica de ELISA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia y distribución espacio-temporal de TB en España

La demanda del diagnóstico de la TB experimentó un importante crecimiento, de manera que entre los años 2008-2010 se analizaron 117 muestras de toros, entre 2011-2013 se analizaron 848 muestras de toro, y sólo en 2014 se recibieron 1110 muestras de sementales. Por ello, la evolución de la prevalencia de la TB se realizó comparando las prevalencias individuales en estos tres periodos de tiempo (años 2008-2010, años 2011-2013 y año 2014).

Los resultados de diagnóstico indican un descenso significativo de la prevalencia individual a lo largo de todo el periodo de estudio ($P < 0,0001$; χ^2). Así, en el periodo 2008-2010 se detectó la presencia de la TB en el 30,8% (36/117) de los toros analizados. En el periodo 2011-2013, la prevalencia descendió hasta el 15,7% (133/848), y en 2014 se detectó un 11,6% (129/1110) de toros infectados. La presencia de TB en las zonas de montaña fue significativamente superior que en zonas de dehesa del oeste peninsular, detectándose prevalencias del 19,5% (71/363) y del 12,8% (62/485), respectivamente ($P < 0,001$; χ^2).

El incremento del número de muestras a analizar, desde 2008 hasta la actualidad, indica que cada vez más ganaderías de vaca nodriza están implementando el diagnóstico de las enfermedades venéreas en sus programas sanitarios. Probablemente, el descenso en la prevalencia observado está en relación con una mayor concienciación por parte de veterinarios y ganaderos sobre la importancia del diagnóstico y eliminación de toros infectados en los rebaños, como única medida existente para el control de la TB en nuestro país. Sin embargo, la prevalencia sigue siendo elevada. El hecho de que el diagnóstico y control de la TB no es obligatorio en España, y que en muchas ganaderías están presentes diversos factores de riesgo, como el uso de pastos comunales, toros compartidos o el comercio de animales de estados sanitario desconocido lleva a pensar que las medidas disponibles no resultan eficaces al 100%. Por ello, el desarrollo y utilización de la vacunación se plantea como una alternativa viable para el control de la enfermedad.

Desarrollo de una vacuna inactivada para el control de la TB

Los resultados de seguridad y eficacia de las formulaciones y vías de administración probadas en este estudio se presentan a continuación.

En relación a la seguridad, no se observaron reacciones sistémicas y, aunque se produjeron reacciones locales en el punto de la inoculación, éstas se resolvieron favorablemente.

Con respecto a la eficacia, el tiempo medio de infección en los grupos vacunados varió entre 33 y 46 días, mientras que las novillas no vacunadas y desafiadas permanecieron infectadas hasta el día 64 (Figura 1; $P > 0,05$, Log-rank). Los mejores resultados se observaron con la formulación B (grupo 3) ya que todos los animales eliminaron la infección antes del día 42.

La protección observada en los grupos vacunados (G1-G4) con respecto al control (G5) estuvo asociada a unos niveles elevados de IgG en suero y de IgA en moco cérvico-vaginal ($P < 0,0001$; ANOVA-Bonferroni).

La formulación B (G3) se presenta como el mejor candidato para el desarrollo de una vacuna frente a la TB. El empleo de una formulación que reduzca el tiempo de infección en las hembras vacunadas antes de que sea un riesgo para el embrión/feto (50-70 días de gestación), podría disminuir las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad (BonDurant et al., 2005; Cobo et al., 2002).

Dada la elevada prevalencia de TB en España y ante la dificultad para controlar la enfermedad en poblaciones expuestas a factores de riesgo, la vacunación podría ser un método viable y eficaz para el control de enfermedad en nuestro país. No obstante, se requiere la realización de pruebas de campo que permitirían evaluar la protección frente a los problemas reproductivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonduranth, RH. 2005. Vet Clin N Am Food Anim Pract. 21:383-408.
- Cobo, ER. et al. 2002. Rev. Med. Vet. 83: 203-208.
- Collantes-Fernandez, E. et al. 2014. Vet. J., 200: 140-

145. • Mendoza-Ibarra, JA. et al. 2012 Vet. J. 193(1): 146-151. • Villarroel, A. et al. 2004. Am. J. Vet. Res., 65(6), 770-775.

Agradecimientos. Agradecemos a todos los integrantes del grupo SALUVET, al personal del SERIDA y a los veterinarios clínicos y ganaderos su participación.

Tabla 1. Resumen de los grupos de la prueba de vacunación.

Grupo	Número de animales	Inmunización (antígeno)	Vía inoculación	Desafío
1	6	A	SC/SC	SI
2	6	A	SC/IN	SI
3	6	B	SC/IN	SI
4	7	Trich Guard®	SC/SC	SI
5	7	PBS	SC/SC	SI
6	3	PBS	SC/IN	NO

SC: subcutánea; IN: intranasal

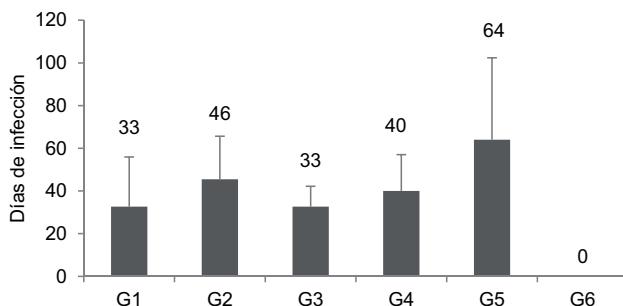


Figura 1. Tiempos medios de infección y desviaciones estándar

EVOLUTION OF BOVINE TRICHOMONOSIS IN SPAIN AND NEW ALTERNATIVES FOR ITS CONTROL

ABSTRACT : The occurrence of bovine trichomonosis (BT) in Spanish beef cattle farmed under extensive conditions has significantly increased in the last years. Nowadays, the control of BT only relies on the identification of infected bulls followed by their removal from the herd. Vaccination has been proposed as an efficient control measure when risk factors (e.g. sharing pastures) are present. However, commercial vaccines are not available in Europe. The present study focused on the follow-up of BT prevalence in Spain from 2008 to 2014, and on the new insights in vaccine development. In the prevalence study, the number of infected bulls significantly decreased from 30.8% during the period 2008-2010 to 11.6% in 2014, probably due to the implementation of BT regular monitoring programs. Nevertheless, the BT prevalence is still high indicating that the test and cull measures are not 100% efficient. This fact highlights the need for other alternatives such as vaccination. In the second study, the safety and efficacy of different inactivated vaccine formulations based on *Tritrichomonas foetus* membrane antigens in combination with saponins were evaluated in an experimental bovine model. All the formulations were safe and reduced the mean time of infection from 64 days to 33-46 days. These promising results point out vaccination as a feasible and efficient measure for BT control in Spain.

Keywords: bovine trichomonosis, prevalence, vaccine, beef cattle.

CINÉTICA DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN VACAS LECHERAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *NEOSPORA CANINUM*

Serrano-Pérez¹, B., Mur-Novales, R., López-Helguera, I., Darwich, L., Cabezón, O., García-Ispierto, I., López-Gatius, F., Almería, S.

¹Dpto. Producción Animal, Agrotecnio, Universidad de Lleida, Lleida, España.
bserrano@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un parásito coccidio intracelular que causa aborto en ganado vacuno a nivel mundial (Dubey y Schares, 2011). En condiciones de campo, los animales naturalmente infectados abortan principalmente en el segundo trimestre de gestación (Almería y López-Gatius, 2013). En condiciones experimentales, se han observado diferencias en la respuesta frente al aborto dependiendo del momento de la infección (Regidor-Cerrillo et al., 2014; Almería et al., 2014). Las infecciones realizadas a principio del segundo trimestre (ej. días 70-90) suelen asociarse con la muerte fetal (Regidor-Cerrillo et al., 2014), mientras que en infecciones posteriores (ej. día 110), aunque generalmente no se produce aborto, se puede observar muerte fetal si el periodo de estudio tras la infección es de 6 semanas (Almería et al., 2010). El objetivo de este estudio fue evaluar la cinética semanal de las poblaciones leucocitarias en novillas gestantes experimentalmente infectadas el día 110 entre el momento de la infección y posterior sacrificio 6 semanas después.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se incluyeron 10 novillas frisonas sanas seronegativas a *N. caninum* y 3 novillas crónicamente infectadas frente al parásito. Todas las novillas fueron inseminadas artificialmente (IA). Los diagnósticos de gestación se realizaron los días 28-34 post IA mediante ecografía transrectal, y se confirmó la gestación a los días 90, 120, 150 mediante palpación rectal. La infección experimental se realizó en 6 animales sanos el día 110 de gestación con 10⁷ taquizoitos de la cepa Nc-Spain7, altamente patógena. De cada animal se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea en tubos con EDTA (5 ml) (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, GB) semanalmente entre los días 110 y 150 de gestación. El recuento total y diferencial de leucocitos se determinó mediante un analizador automático de sangre (HemaVet® Sistema multi-especie de Hematología, Drew scientific, inc., Dallas, EEUU), estandarizado para el análisis de sangre bovina y expresado en número de células por microlitro ($n \times 10^3/\mu\text{L}$). De cada animal se registraron la temperatura rectal y los recuentos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos en el momento de la infección, y los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 post-infección (p.i), así como la incidencia de aborto. Los animales con una temperatura superior a 39,5 °C se consideraron febriles. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza GLM de medidas repetidas con el paquete SPSS v.17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). En caso de que las varianzas no fueran iguales se realizó la prueba de comparación múltiple T2 de Tamhane. Los valores medios se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de aborto se registró en el 50% de los animales infectados experimentalmente. Dos novillas abortaron 2-3 semanas p.i., y se encontró el feto momificado en el momento del sacrificio en otro animal. De acuerdo a los análisis de medidas repetidas (GLM), la infección experimental por *N. caninum* afectó significativamente la temperatura rectal y los recuentos totales y diferenciales de leucocitos (Figuras 1 y 2). Las novillas infectadas experimentalmente presentaron un incremento de la temperatura los días 1-7 y 28-35 p.i. ($P=0,05$ y $P=0,024$, respectivamente; efecto intrasujetos) respecto a los animales sanos o crónicamente infectados (Figura 1). Las novillas experimentalmente infectadas presentaron una tendencia en el incremento de leucocitos los días 1-7 y 28-35 p.i. ($P=0,09$ y $P=0,072$, respectivamente; efecto intrasujetos) (datos no mostrados), asociado al incremento significativo de neutrófilos los días 28-35 p.i. ($P=0,027$, efecto intrasujetos) (Figura 2A). Los recuentos de monocitos fueron significativamente superiores ($P=0,05$, efecto intersujetos)

durante todo el periodo de estudio en las novillas infectadas experimentalmente comparadas con las novillas sanas (Figura 2B).

La mayoría de los animales presentaron los recuentos de leucocitos totales y diferenciales dentro de los rangos de referencia (Smith, 2014). Una novilla presentó leucocitosis (día 21) y neutrofilia (días 14 y 21) en los días previos al aborto probablemente en un intento de control del parásito a nivel placentario. La cinética observada en los neutrófilos y los recuentos elevados de monocitos posiblemente esté asociada al reclutamiento de fagocitos hacia los focos de infección. En un estudio previo, recuentos superiores de monocitos fueron observados en vacas primíparas seropositivas frente a las seronegativas al final del segundo trimestre de gestación (Serrano et al., 2011). Los resultados de este estudio muestran como la infección experimental se asoció a una fuerte movilización de células fagocíticas en las semanas posteriores a la infección en un intento de control del parásito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Almería, S., Araujo, R., Tuo, W., Lopez-Gatius, F., Dubey, J.P. & Gasbarre, L.C. 2010. *Vet. Parasitol.* 169: 304–311. • Almería, S. & López-Gatius, F. 2013. *Res. Vet. Sci.* 95: 303-309. • Almería, S., Serrano-Pérez, B., Darwich, L., Araujo, R.N., López-Gatius, F., Dubey, J.P. & Gasbarre, L.C. 2014. *Vet. Parasitol.* 204: 146-152. • Dubey, J.P. & Echares, G. 2011. *Vet Parasitol.* 180: 90-108. • Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., Castro-Hermida, J.A., Mezo, M., Pérez, V., Ortega-Mora, L.M., González-Warleta, M. 2014. *Vet. Res.* 45: 10. • Serrano, B., Almería, S., García-Ispuerto, I., Yániz, J.L., Abdelfattah-Hassan, A. & López-Gatius, F. 2011. *Res. Vet. Sci.* 90: 457-462. • Smith, B.P. *Large Animal Internal Medicine*. 5th ed. St. Louis, MO: Mosby, 2014: 381–385

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos MICINN (AGL2012-39830-C02-01 y AGL2012-39830-C02-02). R. Mur-Navales disfruta de una beca FPI (BES-2013-063215).

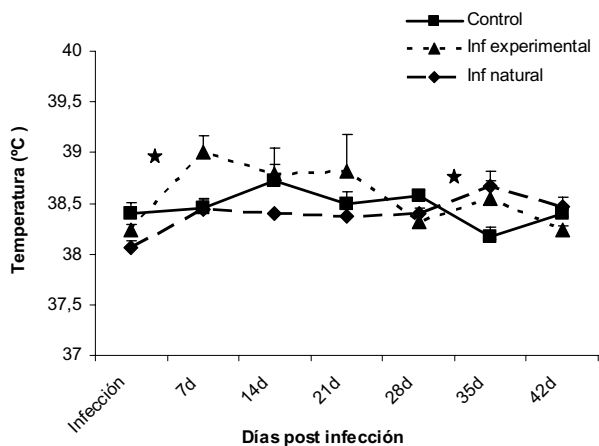
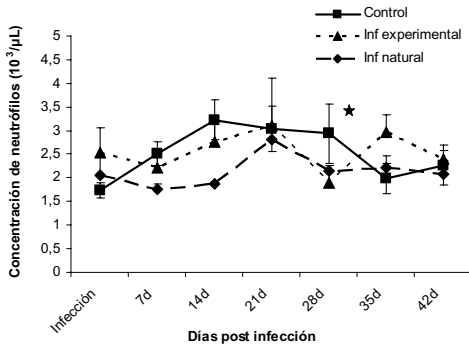


Figura 1. Medias (\pm error estándar) de la temperatura registrada semanalmente entre el día 110 (infección experimental) y 150 de gestación (sacrificio) en vacas gestantes sanas ($n=4$), infectadas naturalmente ($n=3$) y experimentalmente ($n=6$) con *Neospora caninum*.

A)



B)

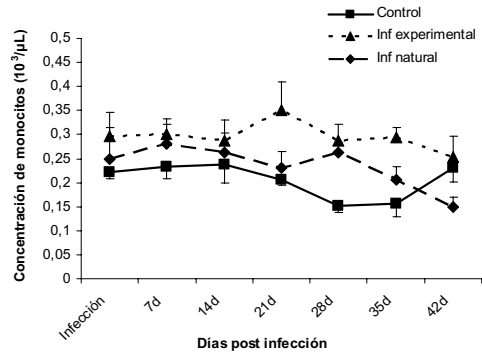


Figura 2. Medias (\pm error estándar, $\times 10^3/\mu\text{L}$) de los recuentos de neutrófilos (A) y monocitos (B) medidos semanalmente entre el día 110 (infección experimental) y 150 de gestación en vacas gestantes sanas, infectadas naturalmente ($n=3$) y experimentalmente ($n=6$) con *Neospora caninum*.

DYNAMICS PERIPHERAL WHITE BLOOD CELLS IN *NEOSPORA CANINUM* EXPERIMENTALLY INFECTED HEIFERS

ABSTRACT: The objective of this work was to study the kinetics of peripheral leukocyte concentrations in *Neospora caninum* uninfected ($n=4$), naturally infected ($n=3$) and experimentally infected ($n=6$) pregnant heifers. Experimental animals were infected at 110 days of gestation with 10^7 tachyzoites of the high pathogenic strain Nc-Spain 7 and were sampled for blood and temperature for 6 weeks after infection. Abortion was registered at some point along the infection period in 3 (50%) on the *Neospora*-experimentally infected heifers. General Linear Model (GLM) repeated measures analysis of variance showed that experimental infection significantly affected temperature, and neutrophil and monocyte counts. Increasing neutrophil counts were observed in experimentally infected heifers on days 28-35 post-infection and significant higher monocyte counts were observed throughout the study period compared to uninfected and naturally infected ones. Increased phagocytes in experimentally infected dams probably are associated to an attempt of the dam to control parasite infection.

Keywords: *Neospora caninum*, pregnancy, heifers, white blood cells.

LESIONES DE LA CERDA EN EXPLOTACIÓN INTENSIVA Y SU RELACIÓN CON LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS

Galé, I¹., Izaquirre, M²., Grandía J³., Daza, A⁴

¹ Cooperativa Agraria San Miguel. Tauste (Zaragoza) ² SAT 2180 Ganadera Unida Comarcal. Valderrobles (Teruel) ³ Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza ⁴ Departamento de Producción Agraria (Unidad de Producción Animal). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid. argimiro.daza@upm.es

INTRODUCCIÓN

El Código Británico de Recomendaciones para el Bienestar Animal establece, entre otras consideraciones, que los animales tienen que estar libres de dolor y daño físico. Las lesiones podales y cutáneas en ganado porcino se contemplan como claros signos de que el animal tiene dolor, falta de salud y confort afectando al bienestar animal pudiendo, como consecuencia, influir en la productividad y en el rendimiento económico de las explotaciones (Buxadé y Montes, 2005). En el presente trabajo, bajo la hipótesis de que las lesiones de la cerda tienen una influencia negativa sobre la productividad, estudiamos, en el escenario productivo de cuatro granjas porcinas situadas en Aragón, el efecto de la explotación y del orden de parto sobre el nivel de lesiones de la cerda, y si tales lesiones tienen influencia sobre los resultados reproductivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En 247 cerdas pertenecientes a cuatro explotaciones situadas en Aragón, dos en Tauste (Zaragoza) (C y M) y dos en Valderrobles (Teruel) (A y V) se determinaron subjetivamente, mediante observación visual de un técnico con experiencia al respecto, las lesiones podales (LP) y lesiones cutáneas (LC) a la entrada de las cerdas en maternidad 5-7 días antes del parto utilizando una escala entre 0 y 3 puntos (de menor a mayor lesión). Las cerdas procedían de parques de gestación similares, con suelo de hormigón y rejilla parcial, en donde se estimaron el nivel de gruñidos y peleas (GP) al comienzo de la formación de los grupos de cerdas gestantes mediante la utilización de una cámara fotográfica GO-DRO. El tamaño de grupo durante la gestación fue de 32 a 35, 11-12, 15-16 y 15-16 cerdas en las granjas M, C, V y A respectivamente administrándose 2, 3, 1 y 1 comidas diarias en las precitadas explotaciones. Se controlaron los resultados del parto de las cerdas (lechones nacidos LN, nacidos vivos LNV, nacidos muertos LNM y destetados LD). Para estudiar el nivel de lesiones se utilizó un análisis de la varianza que observaba como factores principales la explotación y el orden de parto incluyendo además la interacción entre ambos factores. Para estudiar la influencia de las lesiones sobre los resultados reproductivos se realizó otro análisis de varianza que consideraba como efectos principales el orden de parto, las LP, LC y GP y las interacciones dobles entre tales factores. Así mismo, se realizó un análisis de correlación entre las variables reproductivas y el orden de parto, nivel de lesiones LP y LC y el nivel de GP. Los análisis se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS-16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de la explotación y del orden de ciclo aparecen reflejados en la Tabla 1. En la explotación M, se detectó el máximo nivel de LP, mientras que el mínimo nivel de GP se observó en la explotación C donde el tamaño de grupo fue de 11-12 cerdas. De acuerdo con Meunier Salaum y Dantzer (1990) y Lagreca et al (2006), en ganado porcino, el tamaño de grupo ideal que genera menos agresividad está comprendido entre 8 y 10 animales, grupos de hasta 16 individuos se desenvuelven con normalidad, pero cuando conviven más de 25 animales el establecimiento y funcionamiento de las jerarquías se complica considerablemente aumentando la agresividad porque los animales no reconocen el lugar que ocupan sus compañeros en el orden jerárquico. Nuestros resultados no han encontrado una relación explicable entre el número de comidas diarias y la agresividad.

Los niveles de LP y de GP se incrementaron con el orden de ciclo. El efecto del orden de parto sobre las LP puede explicarse por el aumento de peso de las cerdas con el número de

ciclo, lo que, claramente, se traduce en una debilidad de patas (Quiles, 2004). En lo que concierne a los GP, parece que las cerdas viejas, que en un momento determinado de su vida fueron dominantes, se resisten a perder su orden correspondiente en la escala jerárquica y responden, como consecuencia, con una conducta de agresividad manifiesta. Los máximos niveles de LC aparecieron en los ciclos quinto, sexto y séptimo y siguientes.

La interacción explotación x orden de ciclo para las variables LP y GP fueron significativas ($P < 0,05$) Las LP no se incrementaron con el orden de parto en la explotación A y los GP no aumentaron con el orden de ciclo en la C, mientras que en el resto de las explotaciones las LP y GP aumentaron con el orden de ciclo.

La relación observada, mediante regresión simple, entre las variables LC y GP respondió a la ecuación: $LC = 0,24 + 0,46 GP$ ($R^2 = 0,39$, $RSD = 0,68$, $P < 0,0001$), lo que se traduce en que la variabilidad de las LC se explica en un 39% por los GP. Sin embargo, las LP y las LC estuvieron poco relacionadas ($r = 0,15$) así como las LP y los GP ($r = 0,22$).

En la Tabla 2 aparece reflejada la significación estadística de los factores orden de ciclo y niveles de LP, LC y GP sobre las variables LN, LNV, LNM y LD. El orden de parto tuvo influencia significativa ($P < 0,0001$) sobre los resultados reproductivos, aumentando los LNV hasta el tercero y cuarto parto y reduciéndose después en los partos posteriores (10,3, 11,1, 12,0, 12,1, 11,0, 11,3 y 11,0 lechones respectivamente). Sin embargo, un efecto significativo de las lesiones podales sobre LN y LNM fue observado.

Tabla 1. Efecto de la explotación y del orden de ciclo (OC) sobre el nivel de lesiones podales (LP), gruñidos y peleas (GP) y lesiones cutáneas (LC).

Explotación (E)	n	LP	GP	LC
A (15-16)	62	1,25 ^{bc}	1,15 ^{ab}	0,68
C (11-12)	62	1,50 ^b	0,92 ^b	1,03
M (32-35)	69	1,96 ^a	1,39 ^a	0,88
V (15-16)	54	0,93 ^c	1,43 ^a	0,72
sem		0,13	0,13	0,12
OC				
Nulíparas	9	0,96 ^c	0,40 ^c	0,78 ^{bc}
1	38	0,79 ^c	0,72 ^c	0,57 ^c
2	75	1,04 ^{cd}	1,12 ^b	0,83 ^{bc}
3	41	1,40 ^{bd}	0,99 ^{bc}	0,58 ^c
4	20	1,85 ^{ab}	0,99 ^{bc}	0,48 ^c
5	17	1,39 ^{bd}	1,87 ^a	1,37 ^a
6	23	1,76 ^{ab}	1,77 ^a	0,94 ^{ac}
≥ 7	24	2,09 ^a	1,93 ^a	1,06 ^{ab}
sem		0,16	0,15	0,17
P explotación <		0,0001	0,015	0,16
P orden de ciclo <		0,0001	0,0001	0,025
P Ex OC		0,001	0,0038	0,09

() = tamaño de grupo. A = cerdas Large White x Landrace, C = cerdas Duroc x (Large White x Landrace) M = cerdas sintéticas Topics, V = cerdas Landrace. LP, G y P y LC = escala de 0 a 3 de menor a mayor lesión y grado de gruñidos y peleas sem = error estándar de la media. n = n° de cerdas Según factor de variación, medias con distintos superíndices difieren $P < 0,05$.

Tabla 2. Valores de significación estadística de las variables reproductivas respecto a los factores de variación orden de ciclo, lesiones podales (LP), lesiones cutáneas (LC) y gruñidos y peleas (GP).

Factores de variación		LN	LNV	LNM	LD	IDCF
Orden de ciclo	P<	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0035
LP	P<	0,0001	0,70	0,0073	0,93	0,37
LC	P<	0,64	0,93	0,40	0,92	0,67
GP	P<	0,19	0,92	0,015	0,83	0,84

En la Tabla 3 reflejamos las correlaciones entre los resultados reproductivos y el orden de ciclo y lesiones y GP. Entre los LN y las LP se detectó un coeficiente de correlación positivo y significativo ($P < 0,01$), lo que no concuerda con la hipótesis previa establecida en este

experimento, aunque la variable LNM estuvo correlacionada positivamente con las LP. Los coeficientes de correlación encontrados entre las variables reproductivas estudiadas y las LC y el nivel de GP no fueron significativos ($P > 0,05$)

Tabla 3. Correlaciones entre las variables reproductivas y el orden de ciclo (OC) y lesiones podales (LP), lesiones cutáneas (LC) y gruñidos y peleas (GP).

	LN	LNV	LNM	LD
OC	0,29**	0,24***	0,20**	0,16*
LP	0,20**	0,14	0,17*	0,10
LC	0,046	- 0,026	0,089	0,012
GP	0,11	0,0064	0,15*	0,0062

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Se concluye que lesiones podales no demasiado severas no derivan en desviaciones significativas de los resultados reproductivos de la cerda.

Agradecimientos: Este proyecto (Welfare Breeding Pigs) ha sido financiado por el MAGRAMA. Nuestro agradecimiento a la cooperativa GUCO.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buxadé, C., Montes, D. 2005. Bienestar animal y ganado porcino. Ed Mundi Prensa . Madrid, 340 pp
- Lagreca, L., Marotta, E., Ramis, G., Pallarés, F.J., Evangelista, J.N.B., Muñoz Luna, A. 2006. Fisiología del comportamiento. En : Producir carne de cerdo en el siglo XXI, generando un nuevo orden zootécnico. Ed Acalanthis. pp138-150
- Meunier-Salaum, M.C., Dantzer, R. 1990. Behaviour environment relationships in pigs: importante for the design of housing and management systems in intensive husbandry. Pig News and Information 11: 507-514
- Quiles, A. 2004. Factores que inciden en la mortalidad neonatal en los lechones. Producción Animal. enero de 2004.

SOW DAMAGES IN INTENSIVE EXPLOITATION AD RELATION BETWEEN DAMAGES AND REPRODUCTIVE RESULTS

Foot and skin damages levels were controlled according to cycle order in 247 sows from four farms 5-7 days before farrowing. Grunts and fights were recorded at beginning of pregnancy period. Born piglets, stillborn piglets live born piglets and weaned piglets were also controlled. The farm had significant effects on foot damages and grunts and fights level ($P < 0.05$). Gilts and sows of first and second farrowings had less foot damages than the sows old of fourth and more of sixth farrowings. Was not found a reduction of reproductive performance as increased foot and skin damages. Between skin damages and grunts and fights level was detected a relation positive and significant ($P < 0.05$).

Key words: sow, damages, reproductive results.

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE MELATONIA MT₁ Y MT₂ EN EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MORUECO

González-Arto, M.¹, Aguilar, D., Gaspar, E., Hamilton, RST., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A y Casao.A.

¹Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Zaragoza. España.
martagonzalezarto@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La hormona melatonina es una de las sustancias biológicamente activas más antiguas de los organismos vivos y desempeña una gran variedad de funciones (Reiter et al. 2013). Una gran parte de estas funciones las ejerce principalmente interaccionando con los receptores transmembrana acoplados a proteína G, MT₁ y MT₂, los cuales intervienen en diferentes vías de transducción de señal (Dubocovich y Markowska, 2005). La melatonina se sintetiza principalmente en la glándula pineal durante la noche, y, como consecuencia de ello, sus niveles en plasma sanguíneo son prácticamente inexistentes durante el día (Reiter, 1991). Sin embargo, recientes estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia de melatonina en plasma seminal ovino (Casao et al., 2010), y que en este fluido la melatonina mantiene niveles constantes a lo largo del día. Estudios posteriores de nuestro grupo también han verificado la existencia de las enzimas responsables de la síntesis de melatonina en el tracto reproductor de morueco (González-Arto et al., 2014), lo que indicaría una cierta capacidad de síntesis de esta hormona en estos órganos. La melatonina, tanto endógena como exógena, produce una mejora no solo de la calidad seminal, sino también del volumen y la concentración del eyaculado de morueco (Rosa et al., 2012), lo que sugiere una acción de la melatonina sobre la espermatogénesis. Además, debido a su acción antioxidante (Reiter et al., 2000) y antiapoptótica (Casao et al., 2010), la melatonina presente en el tracto genital podría ejercer un efecto protector sobre los espermatozoides no solo durante su formación, sino también en el momento de la eyaculación. Con el objetivo de empezar a comprender el mecanismo de acción de la melatonina en el macho, en este trabajo se analizó la posible existencia de los dos receptores principales de melatonina, MT₁ y MT₂, en los distintos tejidos del aparato reproductor del morueco (testículo, epidídimo y glándulas accesorias).

MATERIAL Y METODOS

Los tejidos analizados en este estudio (testículo, en el que debido a su gran volumen se obtuvieron muestras en zona anterior y posterior, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, conducto deferente, ampolla, próstata, vesícula seminal y glándulas bulbouretrales) se obtuvieron a partir de dos machos ovinos de la raza Rasa Aragonesa sacrificados en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza de acuerdo a la normativa vigente. Una vez obtenidos los tejidos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación. El ARN total se extrajo mediante homogenización de 300 mg de cada tejido en Tri-reagent (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para la retrotranscripción se partió de 500 ng de ARN y se utilizó el kit SuperScript III (Invitrogen, CA, USA). Para amplificar las secuencias específicas de cada receptor se diseñaron cebadores específicos a través de la base de datos del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, Tabla 1). A partir de 2 µL de ADNc de cada tejido se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación, cuyas condiciones fueron 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min y 72 °C durante 30 s. Asimismo, se llevó a cabo un paso de desnaturalización inicial durante 3 min a 95 °C, y al final, 15 min de extensión a 72 °C. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% en un buffer Tris–borato–EDTA (TBE) con 0.5 µL/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA), y se visualizaron posteriormente bajo luz ultravioleta. Como control positivo se utilizó retina de ovino (Coge et al., 2009). Para cuantificar los niveles de expresión génica de los receptores en cada uno de los tejidos, se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando iTaq Universal

SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). La cuantificación se realizó por medio del método comparativo 2- $\Delta\Delta C_t$ y se determinó la expresión relativa de dichos genes en relación a dos genes endógenos (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y actina: por medio del método Pfaff (Pfaff et al. 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la retrotranscripción del ARN obtenido en los distintos tejidos del tracto genital del morueco demostró la amplificación de fragmentos de un tamaño coincidente con el esperable para MT₁ (136 pares de bases (pb)) en todos los tejidos estudiados (Fig. 1A) y para MT₂ (169 pb) en testículo anterior y posterior, así como en la retina (Fig.1B). La PCR a tiempo real para el receptor MT₁ determinó que los niveles de expresión de este receptor eran más elevados en cola de epidídimo, ampolla y conducto deferente que en el resto de los tejidos. En el caso del receptor MT₂, los valores de expresión más elevados fueron los correspondientes al testículo, mientras que el resto de tejidos los niveles de expresión fueron menores, aunque detectables en todos ellos (Fig. 2).

Aunque los altos niveles de expresión génica de los receptores de melatonina en el testículo, sobre todo las observadas en el caso del MT₂, podrían deberse a la expresión génica de los receptores en la membrana de los espermatozoides en formación (Casao et al., 2012) durante la espermatogénesis o la maduración espermática en el epidídimo, la presencia de estos receptores en otros tipos celulares dentro del testículo o el epidídimo tampoco debe descartarse, como sugiere también su presencia en las glándulas accesorias. En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la melatonina podría actuar a través de estos receptores y modular la calidad seminal, y consecuentemente, la capacidad fecundante de los eyaculados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J. A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. Á. 2012. *Reproduction, Fertility and Development* 24 (7): 953-961.
- Casao, A., Cebrián, I., Asumpcao, M.E., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2010. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8 (1): 59.
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, A., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J. A. and Muino-Blanco, T. 2010. *Journal of Pineal Research* 48 (1): 39-46.
- Coge, F., Guenin, S. P., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., Legros, C., Ouvry, C., Cohen, W., Renault, N., Nosjean, O., Malpoux, B., Delagrang, P. and Boutin, J. A. 2009. *British Journal of Pharmacology* 158 (5): 1248-1262.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. *Analytical biochemistry* 162 (1): 156-159.
- Dubocovich, M. L. and Markowska, M. 2005. *Endocrine* 27 (2): 101-110.
- González-Arto, M., Hamilton, TSR., Serrano, E., Aguilar, D., Gaspar, E., Arruga, D., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A. *Reproduction in Domestic Animals* 49 (4), 97-125.
- Pfaff, M. 2001. *Nucleic Acids Research* 29 (9), 2002-2007.
- Reiter, R. J. 1991. *Endocrine reviews* 12 (2): 151-180.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C. and Gitto, E. 2000. *Journal of Biomedical Science* 7(6): 444-458.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S. and Manchester, L. C. 2013. *Mini reviews in medicinal chemistry* 13 (3): 373-384.
- Rosa, H. J. D., Silva, C. C. and Bryant, M. J. 2012. *Small Ruminant Research* 102 (2-3): 197-201.

Agradecimientos: CICYT-FEDER AGL2013-43328-P, DGA A26FSE y Gobierno Vasco (BFI-2010-229 MOD:AE).

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizada para la amplificación por RT-PCR y q-PCR de los receptores para melatonina MT₁ y MT₂, y de los genes endógenos gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y actina.

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
MT ₁	5'-AGGAACGCAGGGAATGTGTTTG-3'	5'-CACTAAGTTGGCAATGCAGGG-3'
MT ₂	5'-CTCTTCCAAGGGCAGCCAG-3'	5'-GGATCATCACCAAACCTCCCG-3'
GAPDH	5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
Actina	5'-CTCTTCCAGCCTTCCTCCT-3'	5'-GGGAGTGATCTCTTTCTGC-3'

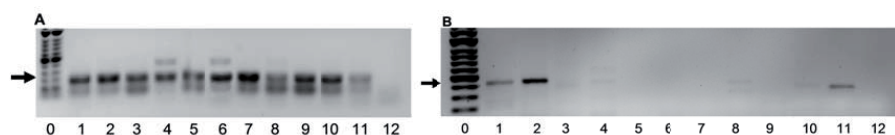


Figura 1. Expresión génica de MT₁(A) y MT₂(B) en testículo anterior (1) y posterior (2), cabeza (3), cuerpo (4) y cola de epidídimo (5), ampolla (6), próstata (7), vesícula seminal (8), conducto deferente (9), glándulas bulbouretrales (10), retina (11) y control negativo (12). Marcador de peso molecular (0); la flechas indican 100 y 150 pares de bases en A y B, respectivamente.

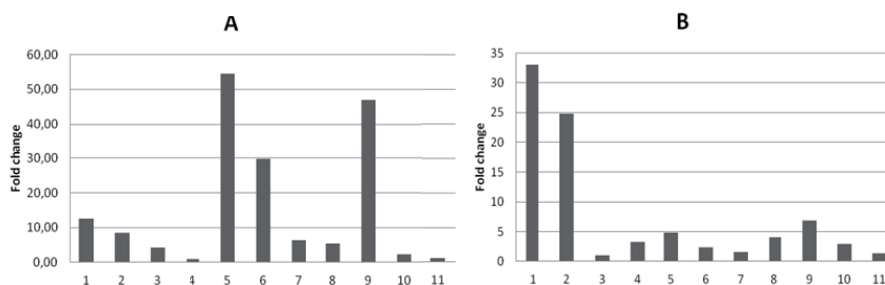


Figura 2. Cuantificación de la expresión génica de MT₁ (A) y MT₂ (B) obtenida por PCR en tiempo real en testículo anterior (1) y posterior (2), cabeza (3), cuerpo (4) y cola de epidídimo (5), ampolla (6), próstata (7), vesícula seminal (8), conducto deferente (9), glándulas bulbouretrales (10) y retina (11).

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF MELATONIN RECEPTOR GENE EXPRESSION, MT₁ AND MT₂ IN THE RAM GENITAL TRACT

ABSTRACT: Melatonin is a ubiquitous molecule present in a wide range of organisms and involved in multiple functions. Many of these actions are mediated by MT₁ and MT₂ G-protein coupled receptors, which are involved in different signal transduction pathways. The objective of this study was to determine the gene expression of the two MT₁ and MT₂ melatonin receptors in the gonads and accessory sexual glands of rams by RT-PCR and quantitative real time PCR. Our findings evidenced that MT₁ and MT₂ mRNA are present in different levels in the gonad, epididymis and sexual glands of the ram. Quantitative real time PCR showed that MT₁ expression levels are higher in the epididymis tail, ampulla and vas deferens whereas the MT₂ highest expression values are in the testis. These results suggest that melatonin may act through these receptors and influence semen quality, and thus, the fertilizing capacity of ejaculates.

Keywords: MT₁ receptor, MT₂ receptor, gene expression, reproductive tract

EFFECTO DE LA EDAD DEL DONANTE Y DE LA APLICACIÓN DE IMPLANTES DE MELATONINA EN LA CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA OVINA

García, W., Tabarez, A., Marin, S., Osuagwuh, U. y Palomo M.J.¹.

Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

mariajesus.palomo@uab.cat

INTRODUCCIÓN

En ovinos, la conducta sexual y la calidad del semen son los principales factores que limitan la eficiencia de la reproducción en el macho a lo largo de año. Los moruecos son reproductores estacionales en los que el fotoperiodo es la señal ambiental principal que controla la actividad reproductiva. Por ello, el uso de implantes de melatonina en el morueco durante la estación no reproductiva se ha asociado con mejoras en parámetros reproductivos como el diámetro escrotal, la producción y calidad espermática (Palacín *et al.*, 2008). Del mismo modo, la estacionalidad puede condicionar los períodos de congelación del semen para su utilización posterior, ya que el semen de morueco congelado en primavera parece ser de peor calidad que el congelado durante el otoño (D' Alessandro y Martemucci, 2003), resultando en una reducción de la movilidad y viabilidad, lo cual disminuye la supervivencia y capacidad fecundante de las dosis conservadas para la inseminación artificial (Maxwell y Watson, 1996). Por último, es preciso recordar que la producción seminal, y por consiguiente, su potencial reproductivo evolucionan de acuerdo a la edad. De tal manera, los moruecos adultos presentan mejor calidad seminal y fertilidad que los jóvenes (Beltrán de Heredia, 2009), hecho que se le atribuye al desarrollo de la madurez sexual, lo que repercute en una mayor calidad seminal y fertilidad de los espermatozoides refrigerados y criopreservados de animales adultos (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008). Así los objetivos del presente trabajo son valorar el posible efecto de la edad del donante de semen y la aplicación de los implantes de melatonina a lo largo de 2 primaveras consecutivas sobre la calidad espermática post-descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este experimento se llevó a cabo en la primavera de 2 años consecutivos. Para ello, en el primer año del estudio, 8 animales (4 de raza Aranesa y 4 de raza Xisqueta) de aproximadamente 16 meses de edad se dividieron en dos grupos homogéneos: el grupo A recibió 3 implantes subcutáneos de 18 mg melatonina (Melovine®, Ceva Salud Animal) por morueco y el grupo B no recibió implante. Al siguiente año, cuando los animales contaban con unos 28 meses de edad fueron también divididos al azar en 2 grupos; a 4 moruecos se les colocó 3 implantes subcutáneos de melatonina (grupo A) y los otros 4 no recibieron implante (grupo B). Pasados dos meses tras colocar los implantes, se les colectó semen con vagina artificial 1 ó 2 días/semana y 2 eyaculados/día en primavera, a la de edad de 18 meses y 30 meses respectivamente. Los eyaculados eran mezclados en un tubo de acuerdo a su grupo experimental, diluidos (1:5, v/v) en la solución TGC compuesta por 0,3 M Tris, 27,75 mM Glucosa, 94,7 mM ácido cítrico (345 mOsm/kg, pH 7.2) y centrifugados a 600g durante 10 minutos por dos veces. Tras descartar el sobrenadante, los sedimentos fueron resuspendidos (1:4) en la solución TGC con una concentración final de 5 % glicerol y 15 % (v/v) de yema de huevo en polvo, 1000 UI/ml de penicilina benzatinica y 1.0 mg/ml de sulfato de estreptomina. Una vez homogenizada las suspensiones, los tubos se introdujeron en un recipiente con 10 mL de agua a 20 °C, se colocaron en una nevera portátil (Dometic-Waeco) a 5°C y fueron trasladados a una cámara de frío. Tras aproximadamente 3h y 30' de refrigeración se les agregó más diluyente hasta alcanzar una concentración final de 400×10^6 de espermatozoides/mL. Las distintas alícuotas refrigeradas a 5°C fueron envasadas en pajuelas de 0,25 mL (IMV, L'Aigle Cedex, France) y selladas con alcohol polivinílico. A continuación, una vez transcurridas 4 horas de refrigeración, las pajuelas fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido (LN²), a 5 cm por encima del nivel de LN² durante 10 minutos, para finalmente ser sumergidas en él para su almacenamiento hasta su descongelación.

Tras la descongelación de las distintas pajuelas (a 37°C durante 30''), se valoró la viabilidad espermática por medio de la tinción de eosina-nigrosina[®] (Hancock, 1957) y la motilidad espermática total y progresiva mediante el sistema ISAS (Proiser R+D S.D., Valencia). Asimismo, se determinó la morfometría espermática a partir de frotis de las diferentes muestras descongeladas teñidas siguiendo el protocolo comercial Diff-Quik mediante el módulo de morfometría de este mismo sistema CASA. Para ello, se empleó la opción de análisis global de la cabeza, midiendo la longitud (L, μm), anchura (W, μm), perímetro (P, μm) y área (A, μm^2) como parámetros referentes al tamaño, así como también analizando la elipticidad (L/W), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación (L-W/L+W) y regularidad ($\pi LW/4A$) como parámetros referentes a la forma de la cabeza. Finalmente, los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), en un diseño factorial, teniendo como factor la edad (1 año vs 2 años) e implantados/no implantados con melatonina (grupo A vs grupo B). Se realizó 6 repeticiones por unidad experimental. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$), se realizó el test de Bonferroni de comparación de medias a posteriori.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez analizados los distintos parámetros descritos anteriormente (Tabla 1), se observó que ninguno de ellos se vio afectado por la aplicación de implantes subcutáneos de melatonina en los sementales ovinos, en ninguna de las dos edades testadas. En cambio, si se observó un significativo incremento de la motilidad total espermática y de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides tras la descongelación a medida que aumentaba la edad de los donantes de semen ($P < 0,001$). Respecto a la forma de la cabeza de los espermatozoides descongelados, no se apreciaron diferencias entre los grupos de animales (con o sin implante) ni entre las dos edades testadas, siendo los valores (media \pm SEM) de elipticidad de $1,8 \pm 0,0$, de elongación de $0,3 \pm 0,0$, de rugosidad de $0,8 \pm 0,0$ y de regularidad de $0,9 \pm 0,0$. Así, la aplicación de los implantes de melatonina no parece mejorar la calidad del semen, una vez descongelado, de machos de 18 y 30 meses de edad. Resultados contradictorios al presente trabajo han sido presentados por Casao *et al.* (2007) y Kaya *et al.* (2000) en moruecos de diferentes razas, donde la aplicación de implantes de melatonina mejoró la motilidad e integridad acrosomal tras la descongelación, mientras que Romao *et al.* (2003) en moruecos de la razas Merina Preta y Campanica no observaron ninguna diferencia en los parámetros de calidad seminal post-descongelación, así como tampoco influyó en la tasa de fertilidad, cuando se comparó espermatozoides de animales tratados con no tratados. Probablemente estos resultados tan dispares se deban a que la mayoría de razas mediterráneas son poco estacionales (Pelletier *et al.*, 2000; Azcona *et al.*, 2001), por lo que la mayoría de tratamientos con implante de melatonina en fotoperiodo positivo no alteran significativamente la calidad del semen en estas localizaciones geográficas. Asimismo, estos resultados contradictorios que exhiben las células espermáticas de la misma especie ante los procesos de criopreservación podrían deberse a factores como la edad, el tipo de crioprotector y aditivos en los diluyentes (Martí *et al.*, 2011). En cuanto a los resultados de morfometría espermática obtenidos tras el proceso de crioconservación, no se mostró ningún cambio significativo en la forma de la cabeza de los espermatozoides en ninguno de los tratamientos estudiados, ni por el efecto de la edad ni por la administración de implantes de melatonina. Sin embargo, teniendo en cuenta las dimensiones obtenidas en las diferentes edades de los donantes, podemos indicar que las modificaciones de los parámetros morfométricos referentes al tamaño de la cabeza tras la criopreservación dependen principalmente de la estabilización de la madurez sexual de los moruecos (Martí *et al.*, 2011). En conclusión, el uso de implantes de melatonina no parece haber proporcionado ninguna ventaja a la hora de conservar espermatozoides fuera del fotoperiodo negativo, probablemente debido a que las razas autóctonas Aranesa y Xisqueta son poco estacionales en cuanto a producción y calidad espermática, siendo más determinante, en nuestro caso, la edad del donante de semen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azcona VA, González AM; Jurado JCM; García-Cervigón M; Pasamontes MDP; Ángulo VM (2001) N° XXVI-SEOC, Sevilla, España. pp: 997-982. • Beltrán de Heredia, I (2009). Eds: Sañudo, C.; Cepero Briz, R. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. pp:

105-114. • Casao, A.; Vega, S.; Pérez-Pe, R.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Palacín, I. (2007) ITEA, Zaragoza, España. pp:6-8. • D'Alessandro, A.G.; Martemucci, G. (2003) *Animal Reproduction Science*, 79: 93–102. • Hancock, J.L. (1957). *J. R. microsc. Soc.*, 76: 84-97. • Kaya, A.; Baspinar, N.; Yildiz, C.; Kurtoglu, F.; Ataman, M.B.; Haliloglu, S. (2000) *Rev Med Vet.*, 151: 1143–1146. • Martí, J.I.; Aparicio, I.M.; García-Herreros, M. (2011) *Theriogenology*, 75: 473–481. • Maxwell, W.M.C.; Watson, P.F. (1996). *Anim Reprod Sci.*, 42: 55-65. • Palacín, I.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Casao, A.; Cebrián, J.A.; Muiño, T.; Palacios, C.; Pontes, J.M. (2008). *Italian Journal of Animal Science*, 7 (2): 199-206. • Pelletier, J.; Bodin, L.; Hanocq, E.; Malpaux, B.; Teyssier, J.; Thimonier, J.; Chemineau, P. (2000). *Biology of Reproduction*, 62:1096-1101 • Rodríguez-Almeida, F.; Ávila, C.O.; Anchondo, A., Sánchez-Ramírez, B.; Jiménez, J.A. (2008) -. *Agrociencia-Mexico*. 42 (4): 399-406. • Romao, R.J.; Bettencourt, E.M.V.; Bettencourt, C.M.V.; Matos, C.A.P. (2003) N° XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 204-209.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el INIA (RZ2009-00008-00-00), la Generalitat de Catalunya (2009SGR0621 y CUR-DIUE), el Fondo Social Europeo y la Fundación Carolina.

Tabla 1. Efecto de la edad del donante y de la aplicación de implantes de melatonina sobre la viabilidad, motilidad y morfometría de la cabeza de espermatozoides ovinos descongelados

Tratamiento	Viabilidad	Motilidad Total	Motilidad Progresiva	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)
18 m (A)	35.73±6.37	30.6±0.5 ^a	18.6±1.7	8.3±0.1 ^a	4.8±0.1 ^a	33.8±0.7 ^a	23.0±0.1 ^a
18 m (B)	40.96±6.14	28.0±2.9 ^a	18.5±3.2	8.4±0.0 ^a	4.8±0.0 ^a	33.4±0.2 ^a	23.1±0.1 ^a
30 m (A)	31.17±3.71	40.0±3.1 ^b	15.7±0.9	8.5±0.0 ^b	5.0±0.0 ^b	35.4±0.3 ^b	23.7±0.1 ^b
30m (B)	41.50±4.24	39.9±1.2 ^b	20.3±2.6	8.5±0.0 ^b	5.0±0.0 ^b	35.3±0.2 ^b	23.7±0.1 ^b

^{a b} Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($P < 0.001$; media \pm SEM, n=6) entre tratamientos (**18m (A)**: 18 meses de edad de los donantes con implantes de melatonina **18m (B)**: 18 meses de edad sin implante de melatonina, **30m (A)**: 30 meses de edad con implante, **30m(B)**: 30 meses de edad sin implante)

EFFECT OF DONOR AGE AND MELATONIN IMPLANT APPLICATION ON RAM SPERM CRYOPRESERVATION

ABSTRACT: The effect of age and melatonin implant on sperm cryosurvival of eight rams during two consecutive springs was studied. In the first spring, the rams (18 months old) were divided into two groups; group A with melatonin implants (*Melovine*®) inserted 60 days before semen collection, and group B without melatonin implants. Semen was collected via artificial vagina and according to the experimental design, fresh ejaculates were immediately mixed, centrifuged twice at 600g for 10min, re-suspended in a Tris-based extender containing 15% powdered egg yolk and 5% glycerol, and refrigerated for 4 hours at 5°C before freezing in liquid nitrogen vapour. The experiment was repeated with the same animals (30 months old) in the next spring. Sperm cryosurvival (mean \pm SEM, n=6) determined with eosin-nigrosin stain showed no significant difference after thawing between group A (35.73 \pm 6.37) and group B (40.96 \pm 6.14) in the first spring. When rams were 30 months old, post-thaw viability in group B (41.50 \pm 4.24) was higher than in group A (31.17 \pm 3.71), but not significantly ($p > 0.05$). Total motility was significantly higher ($P < 0.001$) in frozen sperm of older males irrespective of melatonin. Results from post-thawed sperm morphometry by computer-assisted system (ISAS[®]) showed no difference between the groups but varied significantly ($P < 0.001$) with age.

Keywords: ram sperm cryopreservation melatonin

EFFECTO DE DISTINTAS ESTRATEGIAS ALIMENTARIAS Y DE SINCRONIZACIÓN DE CELO SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN CONEJAS REPRODUCTORAS

Rodríguez, M.¹, Velasco, B.¹, López-Tello J.², García-García R.M.³, Arias-Álvarez M.², Lorenzo P.L.², Rebollar, P.G.¹.

¹Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agrónomos, UPM., ²Departamento de Producción Animal, ³Departamento de Fisiología (Fisiología animal) Fac. Veterinaria, UCM. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid. pilar.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

Para incrementar la receptividad sexual de las conejas, el método más común es el tratamiento con eCG (equine Chorionic Gonadotropin). Un método alternativo en ritmos semiintensivos (inseminación el día 11 post-parto), evitando el uso de hormonas, es la separación de las madres de sus camadas durante 24-48 horas (Alvariño et al., 1998; Bonanno et al., 2004). Los programas de alimentación también se utilizan como método de sincronización de celo debido a la elevada relación entre la condición corporal de la coneja y su productividad (Cardinali et al., 2008). Por tanto, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la sincronización del celo (con o sin hormonas), en combinación con distintas estrategias alimentarias, en los parámetros reproductivos de conejas en distintos estadios productivos (nulíparas y múltiparas lactantes).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se distribuyeron un total de 114 conejas híbridas (Neozelandés blanco x Californiano), bajo condiciones ambientales controladas, según los siguientes diseños experimentales:

- *Experimento 1*: 49 hembras nulíparas de 4,5 meses de edad se dividieron en 2 grupos, uno fue tratado con 25 UI de eCG (grupo eCG; n=20) y otro no fue sincronizado (grupo Control; n=29). Tras la inseminación artificial (IA), 15 animales del grupo control y 10 del grupo eCG se sometieron a una restricción alimentaria del 70% de sus necesidades diarias (130 g/d) durante los primeros 20 días de gestación (R). El resto de animales de cada grupo se alimentaron *ad libitum* (AL).

- *Experimento 2*: 65 hembras múltiparas lactantes fueron alimentadas desde la recría con un pienso comercial (Control; n=30) y un pienso suplementado con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (AGPI; n=35), en el que se incluyó un 6% (30 g/kg) de un suplemento con un 50% de extracto etéreo concentrado a partir de aceite refinado de salmón (Optomega 50, Optivite, International Ltd., España). El día 11 post-parto (pp) fueron sincronizadas de dos modos: 14 animales del grupo control y 18 del grupo AGPI fueron separados de sus camadas durante 24 horas antes de la IA (BIO), mientras que 16 animales del grupo control y 17 del grupo AGPI se sincronizaron con 25 UI de eCG 48 horas antes de la IA.

La ovulación se indujo con 20 µg i.m. de Gonadorelina (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero, León, España). Se determinó la fertilidad [(número de partos/número de inseminaciones) x 100], la prolificidad [número de gazapos nacidos vivos, muertos y totales por parto], y el peso de la camada a nacimiento. Asimismo, en el experimento 1, se calculó el consumo de pienso de las conejas nulíparas desde la IA hasta el día 20 de gestación. Para analizar estadísticamente los resultados se utilizó el software SAS (SAS Institute Inc., 2001). Todas las variables continuas (consumo, prolificidad y peso de los gazapos) se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (proc glm) y para la fertilidad se utilizó una chi-cuadrado (χ^2 , proc catmod). Los efectos estudiados en el experimento 1 fueron el nivel de alimentación y la sincronización de celo, así como su interacción; mientras que en el experimento 2, se analizó el tipo de pienso, el método de sincronización de celo y su interacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados productivos de las conejas nulíparas se muestran en la Tabla 1. El tratamiento con eCG 48 h antes de la IA no afectó a la fertilidad que fue alta en todos los grupos, ya que son nulíparas. Este tipo de hembras son más receptivas que las múltiparas (Rebollar et al., 1994) y si tienen un peso adecuado y una buena condición corporal, su fertilidad suele ser elevada. Una vez inseminadas y aplicada la restricción alimentaria, las conejas que disponían de pienso *ad libitum*, consumieron unos 70 g/d más de pienso que las restringidas hasta el día 20 de gestación. Con respecto a la prolificidad, la eCG no afectó

al número de nacidos totales pero dentro de este grupo, las que habían estado restringidas parieron menos gazapos en total que el resto ($P < 0,1$). Bourdillon et al. (1992) observaron que la eCG aumenta la prolificidad sustancialmente pero sólo en hembras primíparas, no en nulíparas. Además, el tratamiento con eCG, tanto en las restringidas como en las alimentadas *ad libitum*, produjo una elevada mortalidad al nacimiento, ya que más del 40% de los gazapos en estos grupos nacieron muertos ($P < 0,05$). Por otro lado, la mortalidad en las alimentadas *ad libitum* concuerda con los resultados obtenidos anteriormente por Ashworth (1991) y Lawlor et al. (2007) que describen un descenso de la progesterona, que puede modificar el desarrollo endometrial y aumentar la mortalidad a nacimiento, en cerdas "sobrealimentadas". No se observaron interacciones significativas entre el tratamiento de sincronización y el tipo alimentación sobre ningún parámetro productivo.

Tabla 1. Resultados productivos (media \pm SEM) de conejas nulíparas sincronizadas (Sinc.) o no con 25 UI de eCG, 48 horas antes de la Inseminación artificial, y alimentadas *ad libitum* (AL) o restringidas (R) al 70% de sus necesidades energéticas diarias durante los primeros 20 días de gestación.

	Control		eCG		P _{Sinc.}	P _{Alimentación}
	AL	R	AL	R		
Nº hembras	14	15	10	10		
Fertilidad (%)	92,9	80,0	70,0	80,0	n.s.	n.s.
Consumo (g) ¹	201 \pm 6,1 ^a	130 \pm 5,9 ^b	197 \pm 7,7 ^a	130 \pm 7,3 ^b	n.s.	***
Prolificidad						
Nacidos totales	10,8 \pm 1,08 ^a	10,2 \pm 1,08 ^a	11,6 \pm 1,41 ^a	7,2 \pm 1,52 ^b	n.s.	†
Nacidos vivos	8,8 \pm 1,26 ^a	9,2 \pm 1,26 ^a	5,0 \pm 1,65 ^b	4,0 \pm 1,79 ^b	**	n.s.
Nacidos muertos	2,0 \pm 0,88 ^b	1,0 \pm 0,88 ^b	6,6 \pm 1,15 ^a	3,2 \pm 1,24 ^b	***	**
Peso gazapo (g) ²	48,2 \pm 3,16	51,7 \pm 3,16	54,7 \pm 5,48	49,2 \pm 5,48	n.s.	n.s.

¹consumo desde el día de la IA hasta el día 20 de gestación, ²peso camada/nº gazapos vivos; n.s.: no significativo; ***: $P < 0,005$; **: $P < 0,05$; †: $P = 0,06$.

En la Tabla 2 se observan los resultados productivos de las conejas múltiparas lactantes. A pesar de que la receptividad sexual de las conejas lactantes en día 11 pp suele ser muy baja debido al efecto negativo que ejerce en ese momento la producción de leche sobre la respuesta ovulatoria (Castellini y Lattaioli, 1999), la fertilidad aumentó alrededor del 45% en las hembras alimentadas con el pienso control sincronizadas con eCG con respecto a las BIO. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Bourdillon et al. (1992) y Davoust (1994). Sin embargo, en las conejas suplementadas con AGPI este incremento no fue tan acusado y la fertilidad del grupo eCG alcanzó valores intermedios.

Tabla 2. Resultados productivos (media \pm SEM) de conejas lactantes sincronizadas (Sinc.) mediante separación de camada (BIO) o con 25 UI de eCG 48 horas antes de la Inseminación artificial, y alimentadas o no con un pienso enriquecido en AGPI n-3 desde la recría.

	Control		AGPI		P _{Sinc.}	P _{Pienso}
	BIO	eCG	BIO	eCG		
Nº hembras	14	16	18	17		
Fertilidad (%)	35,7 ^b	81,3 ^a	50,0 ^b	58,8 ^{ab}	**	n.s.
Prolificidad						
Nacidos totales	7,6 \pm 2,16 ^b	13,5 \pm 1,34 ^a	7,7 \pm 1,61 ^b	13,7 \pm 1,53 ^a	***	n.s.
Nacidos vivos	7,2 \pm 1,83	9,6 \pm 1,13	7,3 \pm 1,36	9,4 \pm 1,29	n.s.	n.s.
Nacidos muertos	0,4 \pm 1,90 ^b	3,9 \pm 1,18 ^a	0,3 \pm 1,42 ^b	4,3 \pm 1,35 ^a	**	n.s.
Peso gazapo (g)	69,6 \pm 6,82 ^{ab}	57,0 \pm 4,23 ^b	74,1 \pm 5,08 ^a	66,0 \pm 4,82 ^{ab}	†	n.s.

¹peso camada/nº gazapos vivos; n.s.: no significativo; ***: $P < 0,005$; **: $P < 0,05$; †: $P = 0,06$

La suplementación con AGPI no afectó a la prolificidad, ya que son ácidos grasos que pueden mejorar algunos aspectos metabólicos de los animales como reducir el colesterol y

mejorar la respuesta inmune (Santomá, 2012), pero no se han descrito mejoras en el número de crías al parto en conejos (Rebollar et al., 2014). Una separación de 24 h no parece ser lo suficientemente eficaz como la eCG en día 11 pp, siendo necesarias separaciones más largas. Por otro lado, las conejas tratadas con eCG tuvieron más de 13 gazapos totales de media, mientras que el grupo BIO tuvo 6 gazapos menos ($P<0,005$). Bonanno et al. (1990) y Boiti et al. (1995) determinaron que la eCG provoca un mayor crecimiento folicular, una mayor intensidad de ovulación y un mayor número de folículos hemorrágicos que sugieren una estimulación excesiva o anómala de los ovarios. En cualquier caso, aunque no hubo diferencias en el número de gazapos nacidos vivos, las conejas tratadas con eCG parieron alrededor de 4 gazapos muertos más que las conejas separadas de sus camadas (BIO). Por tanto, habría que valorar si este tratamiento hormonal está provocando la implantación de un número demasiado elevado de fetos que compiten por su espacio, o si a nivel feto-placentario se está ocasionando alguna alteración. El incremento del peso de los gazapos a nacimiento producido por la suplementación con AGPI que se ha observado en otros estudios (Rebollar et al., 2014), podría estar enmascarado en este caso por el efecto de la eCG, la cual incrementó la mortinatalidad penalizando el peso de los nacidos vivos del grupo AGPI. No se observaron interacciones significativas entre el tratamiento de sincronización y el tipo de dieta suministrada sobre ningún parámetro productivo.

Se puede concluir que la restricción del alimento en gestación no afecta negativamente a los parámetros productivos de fertilidad, disminuyendo la mortalidad a nacimiento de las conejas nulíparas, por lo que podría ser una propuesta para reducir costes de alimentación en las explotaciones. El tratamiento con eCG ha afectado negativamente a la prolificidad ocasionando una elevada mortalidad de gazapos al nacimiento en ambos experimentos, por lo que no parece un tratamiento de sincronización adecuado. Además, puede atenuar los efectos positivos de la suplementación con AGPI sobre el peso de los gazapos al nacimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Alvariño et al. 1998. World Rabb. Sci. 6, 191–194. •Ashworth C.J. 1991. Anim. Reprod. Sci. 26, 311–321. •Boiti, et al. 1995. World Rabb. Sci. 3, 51–56. •Bonanno et al. 1990. Acta Medica Veterinaria 36, 441–451. •Bonanno et al. 2004. Livest. Prod. Sci. 89, 287–295. •Bourdillon et al. 1992. J. App. Rabb. Res. 15, 530–537. •Castellini, C. & Lattaioli, P. 1999. Anim. Reprod. Sci. 57, 111–120. •Cardinali et al. 2008. Livest. Prod. Sci. 116, 209–215. •Davoust, C. 1994. Cuniculture 115, 25–40. •Lawlor et al. 2007. Arch. Anim. Breed. 50, 82–91. •Santomá, G. 2012. En: XXVIII Curso de especialización. FEDNA. 173-245. •Rebollar et al., 1994. World Rabb. Sci. 2, 87-91. •Rebollar et al. 2014. Anim. Reprod. Sc. 146, 202-209.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CICYT AGL-2011 23822 y la Comunidad de Madrid (S2013/ABI-2913).

EFFECT OF DIFFERENT FEED STRATEGIES AND OESTRUS SYNCHRONIZATION ON PRODUCTION PARAMETERS IN RABBIT DOES

ABSTRACT: Two feed strategies (*ad libitum* throughout pregnancy and restriction during the first 20 days), combined with oestrus synchronization with eCG or not in nulliparous rabbit does, were studied. Moreover, the effects of different diets (control and supplemented with PUFA n-3) and oestrus synchronization, by doe-litter separation or eCG injection, in multiparous lactating rabbit does were also evaluated. Nulliparous group were inseminated at 4.5 months of age, and multiparous group on day 11 post-partum. In both groups, fertility and prolificacy parameters were determined. Feed restriction did not affect fertility, but reduced the mortality in nulliparous females. The hormonal synchronization increased kits mortality in both experiments and covered up for the improvement of weight of newborns in multiparous does supplemented with PUFA.

Keywords: rabbit, synchronization, PUFA, feed restriction.

ESTUDIO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESTRICCIÓN ALIMENTARIA SOBRE EL DESARROLLO FETOPLACENTARIO EN LA CONEJA

López-Tello J.¹, Arias-Álvarez M.¹, García-García RM.², Rodríguez M.³, Formoso-Rafferty N.¹, Bermejo-Poza R.¹, Lorenzo PL.², Rebollar PG.³.

¹Dpto Producción Animal y ²Fisiología (Fisiología animal), Fac. Veterinaria, UCM. ³Dpto Producción Agraria, E.T.S.I.A., UPM. Cdad. Universitaria s/n 28040. pilar.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el precio de las materias primas y por consiguiente, el precio del pienso, ha incrementado los gastos del productor reduciendo sus ingresos (Pascual et al., 2014). Durante la gestación, las necesidades nutricionales de las conejas son muy elevadas por lo que los gastos de producción se disparan. El ajuste del alimento en función de las necesidades nutricionales en las conejas gestantes puede estar indicado una vez que la hembra ha alcanzado su peso adulto y a partir de la segunda gestación, ya que en ese momento las conejas sufren un descenso importante de fertilidad (Rebollar et al., 2009). Durante la gestación la hembra debe reprogramar su metabolismo para el correcto crecimiento fetal y poder tener una adecuada producción láctea para su descendencia (Woods et al., 1998). A su vez, tanto el exceso como la deficiencia de alimento durante la gestación pueden afectar a la prolificidad y por consiguiente, es necesario buscar un equilibrio entre el gasto económico en alimentación sin llegar a perjudicar el desarrollo fetal y de la camada. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto que tienen diferentes pautas de restricción alimentaria en distintos intervalos gestacionales sobre la respuesta ovulatoria y el desarrollo fetoplacentario en conejas múltiparas de alta producción.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó con 32 conejas múltiparas híbridas New Zealand x California alojadas en jaulas individuales y en condiciones ambientales de temperatura y luminosidad controladas (20-25°C, 16HL:8HO). Todas se alimentaron con un pienso comercial (2400 kcal ED/kg, 37% FND y 16% PB) y agua *ad libitum*. Se realizó un control individual de consumo 2 semanas antes de iniciar el experimento, siendo de media 217,0±5,7 g/día/coneja. Las hembras fueron inseminadas (IA) y se distribuyeron en tres grupos según el protocolo alimentario. El primer grupo, denominado grupo control (Grupo C, n=9) fue alimentado *ad libitum* durante toda la gestación, el grupo de restricción parcial (Grupo P, n=11) fue restringido al 50% de su consumo previo diario desde el momento de la IA (día 0) hasta el día 7 de gestación (incluido). Por último, el grupo de restricción total (Grupo T, n=12) fue restringido al 50% desde el día 0 hasta el día 28 de gestación. A día 28 de gestación las hembras fueron sacrificadas de acuerdo con la normativa del Real Decreto 53/2013. En ellas se realizó una laparotomía, extrayendo el tracto uterino junto con los ovarios. A nivel ovárico, se contó el número de cuerpos lúteos por coneja y se calculó la tasa de implantación embrionaria (número fetos normales + fetos macerados + reabsorciones embrionarias/número total de cuerpos lúteos x100). Se extrajeron del útero las unidades fetoplacentarias, para contarlas y clasificar los fetos según su estado (fetos normales, macerados y reabsorciones embrionarias). En aquellos considerados normales se separó al feto de sus bolsas fetales para pesarlo y medir el diámetro biparietal (DBP), diámetro torácico (DT) y la longitud del feto (LON). La placenta de cada individuo también se pesó. Para el tratamiento estadístico de los resultados de consumo de pienso en gestación se realizó un ANOVA (proc MIXED) y la tasa de implantación con una χ^2 (proc CATMOD). Los datos fetoplacentarios se analizaron con un ANOVA (proc GLM) considerando el protocolo alimentario como principal fuente de variación y el tamaño de camada como covariable (SAS, versión 9.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en relación al consumo de pienso en gestación se muestran en la Figura 1. Tras el periodo de restricción, el grupo P aumentó significativamente el consumo de pienso respecto al C en la 2ª y 3ª semana de gestación (+16,86%, +9,64%, respectivamente). Las conejas comen voluntariamente un 25-50% de más durante las 3 primeras semanas de gestación (Fortun-Lamothe et al., 2006), para después en la última

disminuir drásticamente el consumo, a la vez que sus fetos crecen exponencialmente; esto redundaría en un balance energético negativo en este periodo debido a la gran transferencia de nutrientes a los fetos (Fortun Lamothe et al., 1994). Nuestros resultados confirman que en la última semana de gestación, tanto el grupo C como el P disminuyeron drásticamente el consumo de pienso y esta reducción podemos considerarla fisiológica, ya que a medida que sus fetos crecen aumenta la escasez de espacio a nivel abdominal.

En este sentido, Nafeaa et al. (2011) han descrito que, en gestación, el ajuste de la cantidad de alimento suministrado diariamente al 60% del total que ingiere una coneja, afecta negativamente si es aplicado en la segunda mitad, mientras que si se aplica en los primeros 15 días, no se observan efectos adversos ni en la viabilidad ni en el peso de los gazapos al nacimiento, coincidiendo con nuestros resultados (Tablas 1, 2). Este manejo asociado a un suministro *ad libitum* en el último tercio de gestación aumenta el consumo voluntario de las hembras al final de la misma (Manal et al., 2010), justamente cuando las necesidades fetales son mayores. Esto podría mejorar el estado energético de las madres al parto, reduciendo los efectos negativos que tiene la lactación sobre su posterior función reproductiva (mala respuesta ovulatoria y aumento del intervalo parto-inseminación fértil así como, mejorar el peso y la viabilidad de los gazapos). Asimismo es más rentable desde un punto de vista económico porque disminuye el gasto en alimentación de las conejas reproductoras (Manal et al., 2010).

El número de cuerpos lúteos fue similar entre los tres grupos ($P>0,05$; Tabla 1). La tasa de implantación, así como el número de fetos (normales o macerados) o reabsorciones embrionarias a día 28 de gestación también fueron similares entre grupos. Sin embargo, los fetos expuestos a un ambiente adverso la primera semana de gestación (Grupo P) sólo presentaron una menor longitud, mientras que los de las que sufrieron restricción durante toda la gestación, presentaron una reducción significativa de todos los parámetros fetométricos (Tabla 2), respecto a los grupos C y P ($P<0,05$ y $P<0,05$), pudiéndose asociar estas diferencias a un menor peso placentario. En este sentido, se puede decir que la nutrición materna juega un papel vital en el correcto desarrollo fetal, ya que determina la disponibilidad de nutrientes para la transferencia al feto a través de la placenta. Por tanto, este órgano temporal es uno de los mayores determinantes del crecimiento fetal ya que debe de responder a las exigencias nutricionales de los fetos, pero también limitarlo dependiendo del estado fisiológico de la hembra. No obstante, el mecanismo por el cual la placenta regula el paso de nutrientes en situaciones adversas sigue siendo controvertido. Por ejemplo, Heasman et al. (1998), observaron que en la oveja una situación de restricción alimentaria (desde el principio a la mitad de gestación) aumenta el tamaño placentario, sin verse afectado el peso fetal. No obstante, la duración de la gestación en la oveja es relativamente más larga que la de la coneja pudiendo llegar a compensar esta restricción.

En conclusión, una restricción alimentaria del 50% durante la primera semana de gestación seguida de una realimentación está asociada a un mayor consumo de pienso al final de la misma, no viéndose afectada la tasa de implantación embrionaria, ni el desarrollo placentario ni la mayoría de los resultados fetométricos. No obstante, una restricción durante toda la gestación, aunque tampoco ha reducido sensiblemente la tasa de implantación, parece estar asociada a una peor placentación y por consiguiente un menor peso y dimensiones de los fetos. Se necesitan estudios en los que se pueda valorar si se puede compensar un nivel de restricción mínimo en gestación para ahorrar costes de producción, sin afectar a la longevidad de las madres y la viabilidad futura de sus crías.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Fortun Lamothe, et al. 1994. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 201–211
- Fortun-Lamothe, et al. 2006. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 1–15
- Heasman, et al. 1998. *Pediatr. Res.* 44: 546-551
- Manal, et al. 2010 *Anim. Reprod. Sci.* 120:179-186
- Nafeaa, et al. 2011. *Vet. Med. Int.* 1-5.
- Pascual, et al. 2014. *ASESCU.* 171: 58-61
- Rebollar, et al. 2008. *Livest. Sc.* 121: 227-233
- Woods, et al. 1998. *Science.* 280: 1378-1383

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT AGL-2011 23822 y la Comunidad de Madrid (S2013/ABI-2913).

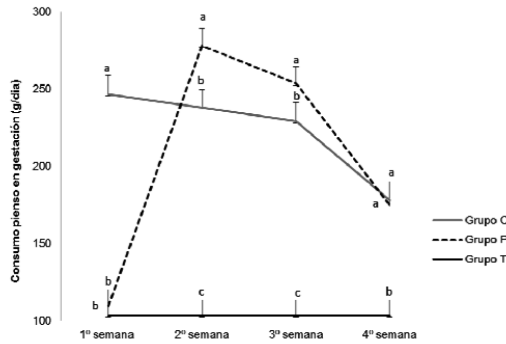


Figura 1. Estimación del consumo de pienso diario durante las semanas de gestación. Media \pm SEM. (a, b; $P < 0,05$).

Tabla 1. Número de cuerpos lúteos, tasa de implantación y desarrollo fetal a día 28 de gestación en conejas control (C=9), parcialmente restringidas (P=11) y totalmente restringidas (T=12) en gestación. Media \pm SEM.

	C	P	T
Cuerpos lúteos	13,6 \pm 0,84	12,7 \pm 0,76	12,0 \pm 0,73
Tasa de implantación (%)	87,5 \pm 9,37	94,7 \pm 8,48	87,5 \pm 8,11
Fetos normales	11,7 \pm 1,16	11,2 \pm 1,05	9,8 \pm 1,00
Fetos macerados	0,2 \pm 0,19	0,4 \pm 0,17	0,2 \pm 0,17
Reabsorciones embrionarias	0,2 \pm 0,20	0,4 \pm 0,18	0,4 \pm 0,18

Tabla 2. Datos fetométricos y placentarios obtenidos a día 28 de gestación en conejas control (C=9), parcialmente restringidas (P=11) y totalmente restringidas (T=12) en gestación. Media \pm SEM. (a, b, c; $P < 0,001$).

	C	P	T
Número de fetos	105	126	117
DBP (cm)	1,7 \pm 0,01	1,7 \pm 0,01	1,7 \pm 0,01
DT (cm)	1,9 \pm 0,02 ^a	1,9 \pm 0,02 ^a	1,8 \pm 0,02 ^b
LON (cm)	9,9 \pm 0,09 ^a	9,5 \pm 0,08 ^b	9,1 \pm 0,08 ^c
Peso feto (g)	42,1 \pm 0,67 ^a	41,1 \pm 0,60 ^a	35,7 \pm 0,64 ^b
Peso placenta (g)	6,0 \pm 0,16 ^a	5,9 \pm 0,14 ^a	4,7 \pm 0,16 ^b

Diámetro biparietal (DBP), Diámetro torácico (DT) y Longitud fetal (LON).

THE EFFECT OF DIFFERENT MATERNAL UNDERNUTRITION PROTOCOLS ON THE FETOPLACENTAL DEVELOPMENT IN RABBIT DOES

ABSTRACT: To evaluate the effect of different feed restrictions on the fetoplacental development in rabbit does, a total of 32 animals were divided in three groups. Group C (n=9) was fed *ad libitum* throughout the pregnancy, whereas group P (n=11) was restricted to 50% of their requirements from day 0 to day 7 of pregnancy and group T (n=12) restricted to 50% throughout the pregnancy. On day 28 of pregnancy, fetuses from group T presented lower placental weight and fetal size respect group C and P ($P < 0.05$). Feed restriction during the first week was related to a lower fetal distance from crown to tail basis respect group C. Does from group P consumed a higher amount of feed respect group C when the restriction period was concluded. In conclusion, a severe feed restriction throughout pregnancy affected negatively the development of the conceptuses, whereas the restriction during the first week reduced crown to tail basis respect group C. However, it was not linked to an altered ovulation or a higher implantational loss rate.

Keywords: pregnancy, feed restriction, rabbit, fetoplacental unit

PIENSOS RICOS EN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS n-3 AUMENTAN LA CONCENTRACION DE PROGESTERONA PLASMÁTICA DURANTE LA GESTACIÓN, Y MEJORAN LA FERTILIDAD Y EL TAMAÑO DE LOS NACIDOS VIVOS EN CONEJAS

Febrel N.¹, Rodríguez M.¹, López-Tello J.², Velasco B.¹, Millán P.³, García-García R.M.³, Arias-Álvarez M.², Lorenzo P.L.³, Rebollar P.G.¹

¹Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agrónomos, UPM. ² Departamento de Producción Animal y ³Fisiología (Fisiología animal), Fac. Veterinaria, UCM. Cdad.

Universitaria s/n 28040. pilar.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

En trabajos previos (Rebollar et al., 2014) hemos demostrado que el suministro de niveles de inclusión bajos (7,5 g/kg), pero de manera prolongada de un suplemento rico en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3 en el pienso de las conejas reproductoras, tiende a incrementar las concentraciones de progesterona los días 5-7 de gestación, aumentando significativamente el tamaño de sus recién nacidos y disminuyendo la mortalidad a nacimiento. Sin embargo, también hemos observado que el consumo de pienso disminuye al incrementar bruscamente los niveles de inclusión de 7,5 a 15 g/kg durante la primera lactación, aunque la fertilidad a segundo parto mejora (Rodríguez et al., 2014). El objetivo de este trabajo fue confirmar si niveles de inclusión de AGPI superiores (30g/kg) y de manera continuada desde la cría, mejorarían aún más los resultados productivos sin alterar el consumo de pienso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 127 conejas híbridas (Neozelandés blanco x Californiano), con 8 semanas de edad, alojadas en la granja experimental de la E.T.S.I. Agrónomos de Madrid (20-25°C, 16HL:8HO) se distribuyeron al azar en dos grupos desde la cría hasta el segundo parto. Se les suministró dos piensos *ad libitum* con igual composición en ingredientes y valor nutritivo (2400 kcal ED/kg, 35% FND y 16% PB) pero suplementados con diferentes fuentes de grasa. En el pienso P (n=64) se incluyó un 6% (30g/kg) de un suplemento con un 50% de extracto etéreo, concentrado en AGPI n-3 [13% DHA (C22:6 n-3), 3% DAPA (C22:5 n-3), 7% EPA (C20:5 n-3), 7% ODTA (C18:4 n-3) y 3% Linoléico (C18:3 n-3)] (Optomega 50, Optivite, International Ltd., España), a partir de aceite refinado de salmón, y en el pienso C (n=63) se utilizó un 3% de grasa mezcla de origen animal (sebo y manteca).

Todas las conejas se inseminaron artificialmente (IA) el mismo día (día 0) con una mezcla heterospermica de semen fresco, y para inducirles la ovulación se les aplicó una inyección intramuscular de 20 µg de un análogo de GnRH (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero, España). La primera IA se realizó a los 4,5 meses de edad y la segunda, después del destete (32 días post-parto). Las conejas negativas de la primera IA se excluyeron del estudio. Se controló el consumo de pienso de las conejas durante la cría, la primera gestación y la primera lactación. También se analizó la fertilidad y la prolificidad obtenidas tras ambas inseminaciones. Las camadas en lactación se ajustaron a 7-10 gazapos. Para determinar si el pienso consumido por las madres antes y durante la primera gestación influyó sobre las medidas de los gazapos al nacimiento, se eligieron 20 camadas de 1 día de edad (10 del grupo P y 10 del grupo C) que tuviesen 10-11 gazapos/camada. Además, a 12 conejas de cada grupo se les tomó una muestra de sangre los días -7, 0, 7, 14, 21 y 28 de la primera gestación para determinar las concentraciones de progesterona. Para ello, se utilizó un kit comercial ELISA de progesterona (Demeditec Diagnostics GmbH, Alemania) basado en el principio de unión competitiva. Previamente, las muestras de plasma se extrajeron con éter de petróleo (la eficiencia de la extracción fue 85%). La sensibilidad fue de 0,045 ng/mL y los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron 5,5 y 6,9%, respectivamente.

Para analizar estadísticamente los resultados se utilizó el software SAS (SAS Institute Inc., 2001). Todas las variables continuas (consumo y prolificidad) se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (proc glm) y la fertilidad mediante chi-cuadrado (χ^2), estudiando en ambos casos el tipo de pienso consumido (control y P) y el número de IA (primera y segunda) como efectos principales, así como su interacción. El efecto del pienso sobre las concentraciones de progesterona antes y durante la gestación se estudió con un análisis de medidas repetidas (proc mixed) con la variable coneja anidada al efecto pienso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las conejas consumieron una cantidad similar del pienso C y P en recría ($190,2 \pm 4,5$ y $180,2 \pm 4,4$ g/d; $P=0,1184$), en gestación ($171,4 \pm 15,1$ y $193,2 \pm 163,5$ g/d; $P=0,3329$) y en lactación ($372,3 \pm 15,3$ y $339,3 \pm 16,3$ g/d; $P=0,1439$), respectivamente. En el grupo control se observó un descenso importante del porcentaje de conejas preñadas después de la segunda IA (Tabla 1), ya que se trata de hembras primíparas y aunque acaban de ser destetadas, se encuentran en una fase de su vida reproductiva crítica en cuanto a la disponibilidad de reservas energéticas para afrontar una nueva gestación. No obstante, en las hembras alimentadas con AGPI no se observó este descenso por lo que dicha suplementación ha favorecido posiblemente su respuesta reproductora. Los resultados de prolificidad fueron altos en ambos grupos, observándose un incremento de la misma y del número de destetados después del segundo parto, ya que a medida que la edad de la coneja aumenta, también es mayor su capacidad de ingestión y su respuesta ovulatoria (Rebollar et al., 2006).

Tabla 1. Fertilidad y prolificidad (media \pm SEM) de conejas alimentadas con una dieta control (C) o con una dieta enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (P) desde la recría hasta el segundo parto.

	C		P		P _{pienso}	P _{IA}	P _{pienso*IA}
	1ª IA	2ª IA	1ª IA	2ª IA			
n	63	51	64	54			
Fertilidad (%)	90,5 \pm 4,55 ^a	68,4 \pm 5,11 ^b	88,9 \pm 4,55 ^a	84,9 \pm 5,01 ^a	n.s.	***	†
Vivos	9,9 \pm 0,38 ^b	11,6 \pm 0,51 ^a	9,6 \pm 0,39 ^b	11,2 \pm 0,48 ^a	n.s.	***	n.s.
Muertos	0,5 \pm 0,15	0,5 \pm 0,20	0,2 \pm 0,15	0,6 \pm 0,19	n.s.	n.s.	n.s.
Destetados	9,1 \pm 0,31	10,2 \pm 0,41	8,8 \pm 0,31	9,3 \pm 0,38	n.s.	***	n.s.

n.s.: no significativo; medias con diferentes superíndices (a,b) indican diferencias significativas (***: $P<0,0001$; †: $P=0,0669$).

Las conejas suplementadas con AGPI parieron gazapos significativamente más grandes tanto en longitud (LON), como en su diámetro biparietal (DBP) y torácico (DT) (Tabla 2). Tal y como se ha descrito en lechones (Rooke et al., 2001), estas dimensiones indican un mayor desarrollo cerebral y corporal en general, por lo que presumiblemente estos gazapos deberían tener una mayor viabilidad los primeros días tras el parto.

Tabla 2. Dimensiones (media \pm SEM) de gazapos de 1 día de edad de conejas alimentadas con una dieta control (C) o con una dieta enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (P) desde la recría hasta el segundo parto. Medias con diferentes superíndices (a,b) indican diferencias significativas (***: $P<0,0001$).

	C	P
Nº de camadas*	10	10
LON (mm)	95,4 \pm 0,87 ^a	101 \pm 0,88 ^b
DBP (mm)	18,3 \pm 0,18 ^a	19,6 \pm 0,18 ^b
DT (mm)	16,1 \pm 0,36 ^a	19,0 \pm 0,37 ^b

*Todas las camadas eran de 10-11 gazapos. LON: Longitud; DBP: Diámetro Biparietal; DT: Diámetro torácico.

Las conejas suplementadas con AGPI presentaron concentraciones de progesterona más altas los días 7 y 14 de gestación (Figura 1). MacLaren et al. (2006) sugieren que el posible efecto beneficioso de los AGPI n-3 sobre la producción de progesterona puede ser debido a la activación de la familia nuclear de PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) en las células luteales. Dichos receptores preservan la función de los cuerpos lúteos de las conejas, tal y como demostró Zerani et al. (2013), y explicarían el incremento de progesterona en los días 7 y 14 de gestación que hemos observado en este estudio. En esos días, la implantación de los embriones y las primeras fases del desarrollo se están llevando a cabo por lo que si existe algún efecto, éste tiene que ser positivo y explicaría el aumento de fertilidad de las conejas del grupo AGPI. Este comportamiento de la progesterona, con el mismo suplemento y a concentraciones más bajas ya se ha descrito

previamente en conejas entre los días 5 y 7 de gestación, aunque no tan marcado, (Rebollar et al., 2014).

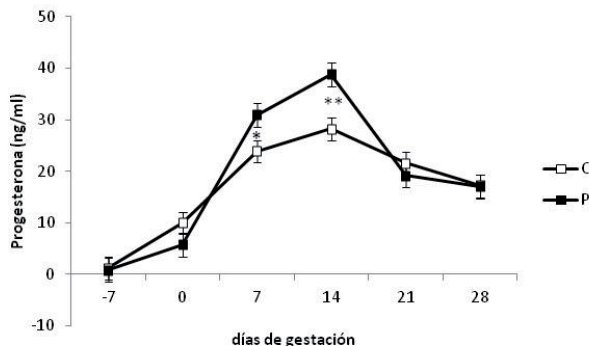


Figura 1. Concentraciones (media \pm SEM) de progesterona (ng/ml) a lo largo de la primera gestación en conejas alimentadas con una dieta control (C; n=12) o con una dieta enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados n-3. (P; n=12) desde la recría hasta el segundo parto. *: P=0,0292. **: P=0,0013

En conclusión, una suplementación de la dieta de conejas reproductoras con AGPI n-3 al 6% desde la recría no afectó al consumo ni a la prolificidad de las mismas, pero mejoró la fertilidad, e incrementó el tamaño de sus gazapos al nacimiento. Además las concentraciones de progesterona en las primeras semanas de gestación aumentaron, pudiendo favorecer los procesos ligados a la implantación embrionaria y al desarrollo placentario.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT AGL-2011 23822 y la Comunidad de Madrid (S2013/ABI-2913).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•MacLaren et al., 2006. *Domest. Anim. Endocrinol* 30, 155-169. • Rebollar et al., 2014. *Anim. Reprod. Sc.* 146, 202-209. • Rodríguez et al. 2014. En XXXIX Sympos. Cunicultura de ASESCU. Tudela, 99-102pp. • Rooke et al., 2001. *British J. Nutr.* 86, 461-470. • SAS Institute. SAS/STAT User's Guide (Release 8.2). SAS Institute Inc., 2001. • Zerani et al., 2013. *Biol. Reprod.* 88, 437-450.

DIETS ENRICHED WITH POLIUNSATURATED FATTY ACIDS n-3 INCREASE PROGESTERONE CONCENTRATIONS DURING PREGNANCY, AND IMPROVE RABBIT DOES FERTILITY AND NEWBORN SIZE

ABSTRACT: One hundred and twenty seven rabbit does were fed *ad libitum* from rearing until 2nd weaning, two isofibrous, isoenergetic and isoproteic diets supplemented with two different fat sources: 3% lard for diet C (control) or 6% of a supplement (Optomega-50; Optivite International Ltd., España) containing a 50% of ether extract and 38% of n-3 polyunsaturated fatty acids for diet P (PUFA n-3). Does were inseminated at 4.5 months of age and then, at 32 days after the first parturition. Fertility and prolificacy were determined. Blood samples were obtained in 12 does of each group at -7, 0, 7, 14, 21 and 28 days of pregnancy to determine plasma progesterone. In addition, 10 litters from each group with 10-11 kits, one day old, were measured determining their length, and their biparietal and thoracic diameters. Feed intake and prolificacy were similar in both groups. Supplementation with PUFA n-3 improved fertility at second AI. Progesterone concentrations on day 7 and 14 of pregnancy in PUFA does, and the size of their kits at birth were also increased.

Key words: PUFA n-3, progesterone, fertility, prolificacy.

EFFECTO DELBICARBONATO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEIN KINASA A (PKA) Y LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA ESPECIE PORCINA

Soriano-Úbeda, C., Matás, C., García-Vázquez, F.A¹

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia
Campus *Mare Nostrum*, 30100, Murcia e IMIB, Murcia. ¹fagarcia@um.es

INTRODUCCIÓN

El proceso de fecundación consiste en la unión de los gametos femenino y masculino para dar origen a un cigoto totipotente. Las interacciones a nivel celular y molecular, así como las condiciones físico-químicas del microambiente en el que la fecundación tiene lugar son muy complejas y no totalmente esclarecidas. Se sabe que los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fecundar, y requieren una serie de modificaciones en el tracto genital de la hembra para adquirir la habilidad de penetrar el ovocito (capacitación espermática). En este sentido, el fluido oviductal ofrece un ambiente esencial para que se desarrollen dichas modificaciones, ya que en su composición se encuentran moléculas como el bicarbonato (HCO_3^-) (Visconti, 2009), que en condiciones *in vivo* se presenta en un rango de concentración de 10 a 33mM (Rodríguez-Martínez, 2007). El HCO_3^- , además, se encuentra implicado en otros procesos relacionados con la capacidad de fecundación, como son los cambios de motilidad e hiperactivación del espermatozoide, y es uno de los principales responsables de la activación de la adenilatociclasa soluble presente en el espermatozoide, activando la vía de fosforilación de sustratos de la proteína kinasa A (PKA), los cuales son indicativos del estado de capacitación espermática (Visconti et al., 1999). El objetivo de este estudio fue intentar reproducir los acontecimientos que tienen lugar de manera fisiológica en torno a la fecundación y esclarecer los niveles de HCO_3^- óptimos para la capacitación espermática y fecundación *in vitro* (FIV) en la especie porcina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se extrajeron espermatozoides de la cola del epidídimo de cerdos sacrificados en matadero. Para ello y tras disección, se introdujo aire a presión en el conducto epididimario con un *abocath* adaptado a una jeringuilla hasta obtener una muestra de espermatozoides por el conducto deferente. Por un lado se estudió la activación de la PKA a través de la señal de fosforilación de los sustratos de PKA mediante western blot (WB). Para ello, las muestras de espermatozoides se incubaron durante 60 min en medio TALP de capacitación (Rath et al., 1999) con diferentes concentraciones de HCO_3^- (0, 15 y 25mM, siendo 25 mM la concentración habitual en los actuales sistemas de capacitación y fecundación *in vitro* en la especie porcina). Además, paralelamente se incubó una muestra de espermatozoides en un medio no capacitante (PBS). Por otro lado, se realizó la FIV de ovocitos porcinos madurados *in vitro* (n=606) en medio TALP con las diferentes concentraciones de HCO_3^- descritas anteriormente. A las 18 h de cocultivo, fueron fijados y teñidos con Hoechst, para posteriormente evaluar en cada grupo experimental y mediante microscopía de fluorescencia el porcentaje de penetración (%PEN), porcentaje de monospermia (%MON), número de espermatozoides por ovocito (SPZ/OVO) y el número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida (ZPBINDING).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de activación de PKA (fosforilación de los sustratos de PKA) mediante WB se muestran en la Figura 1 (A), así como la cuantificación de la señal en cada grupo experimental (Figura 1B). Se observa que las señales obtenidas en los grupos 15 y 25 mM no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$) pero sí con respecto a los grupos PBS y 0 mM ($p<0,05$). De este modo, el HCO_3^- a una concentración de 15 mM produce una activación de PKA similar al habitualmente utilizado en los actuales sistemas de capacitación *in vitro* en la especie porcina (25 mM).

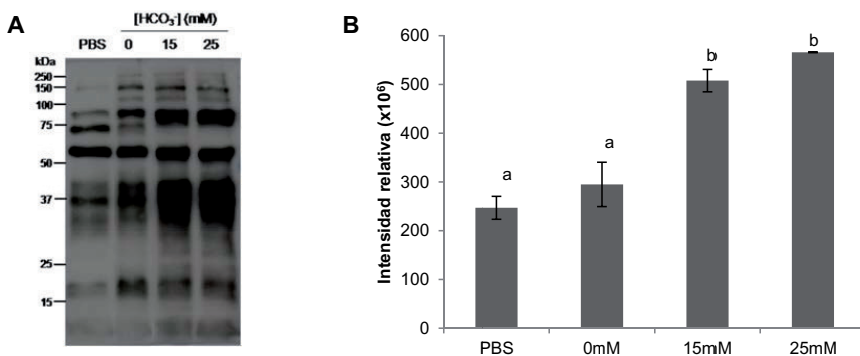


Figura 1. A) Inmunodetección de la fosforilación de los substratos de PKA mediante western blot en espermatozoides epididimarios incubados durante 60 min en medio TALP con diferentes concentraciones de HCO_3^- (0, 15 y 25 mM) y en medio no capacitante (PBS). B) Cuantificación de la intensidad relativa de señal obtenida en la inmunodetección de la activación de PKA en los diferentes grupos experimentales. El gráfico representa la media \pm S.D. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Además, en los resultados obtenidos en la FIV (Tabla 1), los tres grupos experimentales muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0,05$). Por un lado, la ausencia total de HCO_3^- hace imposible la penetración de ovocitos (0mM: 0 ± 0 %PEN) ya que para obtener una capacitación espermática, interacción espermatozoide-ovocito y fecundación correctas, el ión HCO_3^- es esencial (Harrison, 1996). Sin embargo, aunque los sistemas actuales de FIV porcina con 25 mM de HCO_3^- proporcionen un elevado %PEN ($97,42 \pm 1,14$), los resultados de monospermia y, por tanto, de éxito de la técnica de FIV y obtención de cigotos potencialmente viables, son muy bajos (%MON: $10,05 \pm 2,19$). Al reducir la concentración de HCO_3^- en el medio de FIV a 15 mM, observamos que aunque el %PEN es inferior ($79,61 \pm 2,81$) el %MON aumenta significativamente, lo que incrementa la eficiencia de la técnica en un 31% con respecto al grupo 25 mM.

Tabla 1. Parámetros de FIV de ovocitos porcinos con espermatozoides epididimarios en un medio con diferente concentración de HCO_3^- (0, 15 y 25 mM): % penetración (%PEN), % monospermia (%MON), n° espermatozoides por ovocito (SPZ/OVO) y n° espermatozoides unidos a la ZP (ZPBINDING). Los resultados se expresan como la media \pm E.S. Diferentes superíndices (^a, ^b, ^c) en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

GRUPO	%PEN	%MON	SPZ/OVO	ZPBINDING
0mM (n=216)	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a	$0,29 \pm 0,04^a$
15mM (n=206)	$79,61 \pm 2,81^b$	$32,93 \pm 3,68^b$	$3,99 \pm 0,27^b$	$4,89 \pm 0,53^b$
25mM (n=194)	$97,42 \pm 1,14^c$	$10,05 \pm 2,19^c$	$6,72 \pm 0,37^c$	$8,94 \pm 0,72^c$

De este modo, 15 mM se postula como una concentración de HCO_3^- más adecuada para la FIV, ya que permite un mayor rendimiento en la obtención *in vitro* de cigotos monospermicos y, por tanto, de embriones potencialmente viables. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de reajustar la concentración de HCO_3^- en los actuales sistemas de capacitación espermática y fecundación *in vitro* en la especie porcina, pues una concentración menor a la comúnmente utilizada es suficiente para optimizar el rendimiento de estas técnicas, lo que

podría suponer una mayor rentabilidad en los actuales sistemas de producción *in vitro* de embriones en la especie porcina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Harrison, R.A.P. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8, 581-594. • Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L., Johnson, L.A. 1999. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77, 3346-3352. • Rodríguez-Martínez, H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68, 138-143. • Visconti, P.E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 667-8. • Visconti, P.E., Ning, X., Fornes, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A., Kopf, G. S. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214, 429-443.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competencia (MINECO) y por el Fondo de Desarrollo Regional Europeo (FEDER; código del proyecto, AGL2012-40180-C03-01).

EFFECT OF BICARBONATE ON PROTEIN KINASE A (PKA) ACTIVATION AND ON *IN VITRO* FERTILIZATION OUTPUT IN PORCINE

Abstract: Prior to their encounter with the oocyte, spermatozoa have to experiment some modifications to get the ability to fertilize the egg, the sperm capacitation. Some of the components of the oviductal fluid (such as HCO_3^-) play an essential role during sperm capacitation. This study attempts to apply the optimal HCO_3^- concentration during *in vitro* fertilization (IVF) process in porcine. First, the effect of different concentrations of HCO_3^- (0, 15 and 25 mM) on PKA substrates phosphorylation (indicative of capacitation) was evaluated in epididymal sperm; second, the IVF was performed with different HCO_3^- concentrations in order to improve the efficiency of viable zygotes production. The results showed that 15 mM of HCO_3^- produces a similar effect on sperm PKA activation ($p > 0.05$) that when 25 mM of HCO_3^- was achieved. Moreover, when 15 mM of HCO_3^- was used in IVF medium a greater efficiency was observed compared to other groups. Although 15 mM group offers less penetration (0 mM: 0 ± 0^a , 15 mM: 79.61 ± 2.81^b , 25 mM: 97.42 ± 1.14^c ; $p < 0.05$), the monospermy was the highest (0 mM: 0 ± 0^a , 15 mM: 32.93 ± 3.68^b , 25 mM: 10.05 ± 2.19^c ; $p < 0.05$). These facts could indicate the necessity of readjust the HCO_3^- concentration in the current systems of sperm capacitation and IVF in swine.

Keywords: bicarbonate, PKA, *in vitro* fertilization, porcine.

EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS EZRINA, HSP70-1A Y HSP90 α EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* PORCINA

Canha, A., García-Martínez, S., Coy, P. y Romar, R

Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria. 30071 Campus Espinardo, "Campus Mare Nostrum". IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biomédica). Universidad de Murcia. rromar@um.es

INTRODUCCIÓN

El endurecimiento prefecundación de la zona pelúcida (ZP) de los ovocitos ejercido por proteínas presentes en el fluido oviductal es reponsable, en parte, del bloqueo de la polispermia en la especie porcina. Entre las proteínas responsables de este endurecimiento se encuentran la osteopontina (SPP1) (Hao et al., 2006) y la oviductina (Coy et al., 2008a). Recientemente nuestro grupo ha identificado otras proteínas que están presentes en el fluido oviductal que endurece la ZP pero ausentes en fluido que no ejerce este efecto (Mondéjar et al., 2013). Entre las proteínas con posible efecto endurecedor se encuentran la ezrina y otras de la familia de las proteínas de choque térmico (heat shock proteins, HSP) como la HSP70-1A y la HSP90 α . La ezrina tiene un papel conocido en la capacitación espermática mediante la formación del complejo ezrina-radixina-actina (Wang et al., 2008). Por su parte, las HSP son una amplia familia de proteínas chaperonas, altamente conservadas entre especies, con numerosas funciones descritas sobre la fecundación y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos (revisado por Neuer et al., 2000). Sin embargo, el posible papel de estas proteínas en el mecanismo de endurecimiento de la ZP y la posterior fecundación en condiciones *in vitro* no se ha estudiado todavía. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la ezrina, HSP70-1A y HSP90 α sobre el endurecimiento de la ZP y los resultados de la fecundación *in vitro* en ovocitos porcinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de cerdas prepúberes (Landrace x Large White) mediante la aspiración de los folículos entre 3-6 mm de diámetro y se transfirieron a medio de maduración NCSU-37 siguiendo los protocolos de nuestro laboratorio (Coy et al., 2008). Una vez maduros (42-44 h), los ovocitos se denudaron y se incubaron 1h en medio TALP suplementado con ezrina (200 ng/ml; #ab91744, Abcam), HSP70-1A (550 ng/ml; #ADI-ESP-555, Enzo Life Sciences) y HSP90 α (550 ng/ml; #ADI-SPP-776, Enzo Life Sciences). El grupo control se mantuvo en medio TALP sin proteínas. Pasado el tiempo de incubación, los ovocitos se lavaron en PBS y se valoró el tiempo de digestión de la ZP a 38,5°C transfiriéndolos a una solución de pronasa al 0,5% en PBS. Se realizaron cuatro replicados con 6-7 ovocitos por grupo. En un segundo experimento, los ovocitos maduros se denudaron, se lavaron en medio TALP y se transfirieron a pocillos conteniendo 250 μ l de medio TALP suplementado con las proteínas a la concentración indicada anteriormente para ser inseminados (25-30 ovocitos/pocillo). Los espermatozoides, procedentes de la fracción rica del eyaculado de verracos de fertilidad probada, se diluyeron 1:1 v/v en BTS (Pursel y Johnson, 1975) y se centrifugaron (700g, 30 min) en un gradiente 45-90% v/v de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (Coy et al., 2008). El pellet obtenido se diluyó en medio TALP, se centrifugó de nuevo (100g, 10 min) y el sedimento se resuspendió en medio TALP para añadirse a los pocillos conteniendo los ovocitos, a una concentración final de 2×10^4 espermatozoides/ml. Los gametos se co-cultivaron 18-20 h y se realizaron tres replicados. Pasado este tiempo los posibles cigotos se fijaron 30 min en glutaraldehído al 0,5% en PBS y para teñir el ADN se incubaron posteriormente 15 min con Hoechst 33342 (1mg/ml en PBS; #B-2261; Sigma-Aldrich, Madrid, España). Tras la fecundación se valoró la penetrabilidad espermática, la formación de pronúcleo masculino, la monospermia y el número de espermatozoides adheridos a la ZP. Los datos se presentan como media \pm SEM. Las variables (tiempo de digestión de la ZP y parámetros de FIV) fueron analizadas mediante un ANOVA y las diferencias se consideraron significativas para $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de digestión de la ZP mostraron un efecto significativo de las tres proteínas estudiadas sobre el endurecimiento de la ZP tras la incubación de los ovocitos. La ZP del grupo control tardó en digerirse $66,0 \pm 2,1$ s ($n=27$) y la incubación con HSP70 y HSP90 α aumentó este tiempo a $81,6 \pm 2,8$ s ($n=25$) y $79,7 \pm 3,8$ s ($n=25$) respectivamente ($P<0,0001$). La ezrina fue la proteína que indujo un mayor efecto endurecedor ($113,9 \pm 3,5$ s; $n=25$) siendo mayor al grupo control y a ambas HSPs ($P<0,0001$). A pesar de que el endurecimiento de la ZP se puede calificar de discreto, los resultados preliminares de FIV se mostraron en consonancia con lo observado. Así pues, los ovocitos inseminados en presencia de ezrina mostraron una penetrabilidad significativamente inferior a la del grupo control y a ambas HSPs (Tabla 1; $P<0,0001$). Consecuentemente, el número de espermatozoides por ovocito penetrado fue menor en el grupo ezrina aumentando así los porcentajes de monospermia de valores en torno al 20%, para los grupos control y HSPs, a casi el 80% para el grupo ezrina. Curiosamente, el efecto de la ezrina sobre el descenso de penetrabilidad no parece deberse a la disminución del número de espermatozoides que se une a la ZP, ya que éste fue similar al grupo control (en torno a 25 células). Este efecto sobre la penetrabilidad no se observó para ambas HSPs. Una hipótesis para explicar estos resultados sería que estas proteínas estuvieran ejerciendo un efecto favorecedor sobre la funcionalidad espermática capaz de superar el discreto endurecimiento que realizan sobre la ZP. Ambas proteínas tienen un efecto demostrado sobre la interacción entre gametos y están presentes en los espermatozoides porcinos, donde varían su localización conforme se produce la capacitación y reacción acrosómica (Spinaci et al., 2005; Volpe et al., 2008). En cerdos, la fecundación in vitro en presencia de anti-HSP70 reduce la penetrabilidad (Spinaci et al., 2005) y la HSP90 regula la motilidad espermática (Huang et al., 2000) por lo que se hacen necesarios más replicados de FIV y estudios de funcionalidad espermática para dilucidar el efecto de estas HSPs sobre la interacción entre gametos.

En la especie porcina, la relación directa entre el endurecimiento de la ZP y el descenso en la penetrabilidad ya ha sido descrita previamente por nuestro grupo (Cánovas et al., 2009; Coy et al., 2008b). En este estudio, el endurecimiento inducido por la ezrina fue discreto pero los cambios inducidos parecen ser suficientes para traducirse en un marcado descenso de los espermatozoides con capacidad para atravesar la ZP y fecundar al ovocito. Por otra parte, la ezrina podría estar afectando a la funcionalidad espermática. Recientemente, Piehl et al. (2013) han descrito la presencia de ezrina en exosomas de verraco atribuyéndole una función estabilizadora de la membrana celular previniendo así la capacitación espermática. Una hipótesis sería que la concentración de ezrina utilizada durante el cocultivo de los gametos en nuestro estudio podría estar afectando la funcionalidad espermática. Se requieren más estudios para valorar el posible efecto de esta proteína sobre la capacitación y reacción acrosómica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cánovas, S., Romar, R., Grullon, L.A., Aviles, M. & Coy P.2009. *Reproduction*. 137: 803-812.
- Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullón, L., Matás, C. & Avilés, M. 2008a. *ProcNatlAcadSci USA*. 105: 15809-15814.
- Coy, P., Grullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C. & Aviles, M. *Reproduction*. 2008b. 135:19-27.
- Hao, Y., Mathialagan, N., Walters, E., Mao, J., Lai, L., Becker, D., Li, W., Critser, J. & Prather, R.S. 2006. *Biol Reprod*.75: 726-298.
- Huang, S.Y., Tam, M.F., Hsu, Y.T., Lin, J.H., Chen, H.H., Chuang, C.K., Chen, M.Y., King, Y.T., Lee, W.C. 2005. *Theriogenology*. 64: 1940-1955.
- Mondéjar, I., Martínez-Martínez, I., Avilés, M. &Coy, P. 2013. *Biol Reprod*. 89: 67-74.
- Neuer, A., Spandorfer, S.D., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z&Witkin, S.S. 2000. *Hum Reprod Update*. 6:149-159.
- Piehl, L.L., Fischman, M.L., Hellman, U., Cisale, H., Miranda, P.V. 2013. *Theriogenology*. 79: 1071-1082.
- Spinaci, M., Volpe, S., Bernardini, C., DeAmbrogi, M., Tamanini, C., Seren, E., Galeati, G. 2005. *Mol Reprod Dev*. 72: 534-541.
- Pursel, V.G. & Johnson, L.A. 1975. *J. Anim Sci*. 40: 99-102.
- Volpe, S., Galeati, G.,

Bernardini, C., Tamanini, C., Mari, G., Zambelli, D., Seren, E., Spinaci, M. 2008. *Reprod Dom Anim.* 43: 385-392. •Wang, L., Chen, W., Zhao, C., Huo, R., Guo, X.J., Lin, M., Huang, X.Y., Mao, Y.D., Zhou, Z.M. & Sha, J.H. 2010. *Asian J Androl.* 12: 667-676.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER; código del proyecto, AGL2012-40180-C03-01).

Tabla 1: Efecto de las proteínas sobre los resultados de fecundación *in vitro*. PEN: porcentaje de ovocitos penetrados respecto a los inseminados; MON: porcentaje de ovocitos monospermicos respecto a los penetrados; SPZ/O: número medio de espermatozoides por ovocito penetrado; PNM: porcentaje de ovocitos con pronúcleo masculino; SPZ/ZP: número medio de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida.

Grupo	N	PEN (%)	MON (%)	SPZ/O	PNM (%)	SPZ/ZP
Control	80	86,2±3,9a	22,0±5,1a	2,8±0,2a	97,0±2,06	26,9±1,3ab
HSP70-1A	82	75,6±4,8a	29,0±5,8a	2,4±0,2a	100	33,0±1,9c
HSP90α	81	86,3±4,9a	18,0±5,9a	2,6±0,2a	100	28,6±1,3ac
Ezrina	78	28,0±5,1b	78,0±8,8b	1,3±0,1b	100	23,7±1,3b
P valor		<0,0001	<0,0001	<0,0005	0,2837	<0,0001

a,b,c: en la misma columna indican diferencias entre grupos

EFFECT OF EZRIN, HSP70-1A AND HSP90α PROTEINS ON PORCINE IN VITRO FERTILIZATION

ABSTRACT: The prefertilization hardening of the zona pellucida (ZP) decreases polyspermic fertilization in pigs. Specific proteins responsible of that ZP changes are the osteopontin (SPP1) and oviductin (OVGP1). Recently, other oviductal factors have been identified as potential inducers of ZP hardening. Among these proteins are ezrin and heat shock proteins such as HSP70-1A and HSP90α. However, its potential role on ZP hardening and further fertilization results have not been studied yet. This work was designed to test whether the incubation of *in vitro* matured pig oocytes with these proteins can harden the ZP and affect further fertilization results. Incubation of matured oocytes for 1 h in TALP medium supplemented with ezrin (200 ng/ml), HSP70-1A (500 ng/ml), HSP90α (500 ng/ml) or without protein (control group) showed differences in ZP digestion time being higher in the ezrin group (113.9 ± 3.5 s; n=25) compared with control (66.0 ± 2.1 s; n=27), HSP70-1A (81.6 ± 2.8 s; n=25) and HSP90α group (79.7 ± 3.8 s; n=25). Presence of ezrin during gametes coculture showed a significant decrease in penetrability and an increase on monospermy rate. The role of ezrin preventing sperm capacitation may explain these results but further studies are necessary to confirm this hypothesis.

Keywords: ezrin, Hsp70-1A, Hsp90α, fertilization

COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL LÍQUIDO FOLICULAR EN CABRAS ADULTAS Y PREPÚBERES Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES Y LA ALIMENTACIÓN

Soto, S., Català, M. G., Roura, M., Contreras-Solís, I., Izquierdo, D. y Paramio, M. T.
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. España. Teresa.Paramio@uab.es

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos (AG) presentes en el líquido folicular (LF) influyen en la calidad del oocito y en el desarrollo embrionario. Las concentraciones de AG en LF dependen de la concentración en plasma y de la dieta (revisado por Leroy et al., 2014). Diversos investigadores han estudiado el contenido de AG en LF y sus variaciones dependiendo de diferentes factores como el tipo de foliculo y su actividad o las modificaciones en la dieta (revisado por Dunning et al., 2014). A su vez, se ha visto como el uso de determinados AG afecta en el proceso de la producción *in vitro* de embriones (Marei et al., 2009 y 2010). Hasta la fecha, no existen estudios publicados sobre la composición de AG en el LF en cabras.

Por otro lado, sí existen publicaciones en cabras sobre el contenido de AG de la leche (Castro-Gómez et al., 2014) estando afectado por factores como el rebaño, la alimentación (Renna et al., 2012) o la época del año (Czarniawska-Zajac et al., 2006). Según Czarniawska-Zajac (2006) la época del año provoca variación en el perfil lipídico por la diferente composición de la dieta, sobre todo debido al acceso a forraje fresco en las estaciones de pastoreo.

En nuestro laboratorio, en cabras prepúberes se han observado diferencias en el porcentaje de blastocistos producidos *in vitro* según la estación del año, con un menor porcentaje en otoño (4,7 %), respecto al resto de las estaciones (invierno: 15,8 %; primavera: 16,2 %; y verano: 10,4 %), a pesar de ser fisiológicamente la época reproductiva (Catalá et al., 2015). El objetivo del presente estudio es analizar la composición de AG del LF en cabras adultas y prepúberes y sus variaciones por época del año, con tal de valorar si se pueden asociar al porcentaje de blastocistos producidos *in vitro* en nuestro laboratorio, así como a la dieta y la composición de la leche.

MATERIAL Y MÉTODOS

El LF de cabras adultas se obtuvo mediante *Laparoscopic Ovum Pick-Up* (LOPU) de 12 cabras Murciano-Granadina de 5 a 7 años estabuladas y alimentadas durante todo el año con heno de alfalfa *ad libitum*. Se llevaron a cabo de 1 a 5 sesiones de LOPU por cabra en las cuatro estaciones del año siguiendo la técnica descrita por Romaguera et al. (2011) aspirando los folículos entre 2 a 9 mm de los cuales se obtuvo un *pool*. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética de la Experimentación Animal y Humana (Gobierno de España, autorización número DARP 591) y bajo la supervisión de la Comisión de Ética de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). El LF de cabras prepúberes se obtuvo mediante aspiración de los folículos de ovarios de hembras lactantes de 1 a 2 meses de edad, recuperados de un matadero local en las diferentes estaciones.

El líquido folicular recién obtenido se centrifugó dos veces a 500 x g durante 10 min y se congeló a -80°C hasta su extracción para análisis con cromatografía de gases, en el Servicio de Análisis Químico de la UAB. Se utilizó el protocolo de Sukhija y Palmquist (1988) con algunas adaptaciones. Para la extracción, se mezclaron con un vortex 200 µL de muestra (100 µL LF + 100 µL PBS) durante 60 s con 450 µL de tolueno, 50 µL de ácido nonadecanoico (como estándar interno) y 1 mL de HCL (5 %). Luego se calentó al baño maría durante 1 h a 70°C. Seguidamente, se añadió 1,25 mL de K₂CO₃ (12 %) y 500 µL de tolueno, se mezcló con un vortex durante 30 s y se centrifugó durante 5 min a 1000 G. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se secó con Na₂SO₄. Los extractos se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis con cromatografía de gases (123-2362, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). Se analizaron un total de 18 ácidos grasos, aunque para el presente estudio seleccionamos solo los 6 más relevantes.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con el procedimiento de modelos lineales (GLM) del paquete estadístico SAS (versión 9.3; SAS Institute Inc., EE.UU.). Las medias fueron comparadas con LSMEAN y ajustadas por TUKEY.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los AG encontrados en mayor porcentaje en LF de cabras adultas fueron el palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico (26,81 %, 23,59 %, 22,67 %, 9,88 % y 5,31 %, respectivamente). Estos resultados son similares a los encontrados en LF de vacuno, ovino y porcino (revisado por Leroy et al., 2014). En LF de prepúberes, encontramos los mismos AG principales pero en diferente concentración: oleico, palmítico, esteárico, linoleico y araquidónico (27,53 %, 23,44 %, 16,47 %, 12,02 % y 9,18 %, respectivamente). Considerando que su dieta se compone básicamente de leche de cabra, es interesante comparar estos resultados con la composición de la leche. Si observamos los resultados obtenidos por Ceballos et al. (2009) y Castro-Gómez et al. (2014) en leche de cabras de razas españolas, vemos que, igual que en LF, el palmítico es el AG principal, y el esteárico y el oleico se encuentran en alta proporción. En cambio, el mirístico y el cáprico son elevados en leche, pero bajos en LF (el cáprico no fue detectado con cromatografía). Por último, el linoleico y el araquidónico, elevados en LF, se encuentran en más baja cantidad en leche. Si la composición del LF dependiera solo de la dieta, se esperaría que en LF de cabras lactantes hubiera la misma variación de AG que en leche. Pero además de la dieta, depende del metabolismo de los oocitos y células del cúmulus (Bender et al., 2010).

Según la época del año observamos diferencias de AG en LF de cabras adultas, independientemente de que la dieta fuera la misma durante todo el año. Estas son: en primavera más SFA que en invierno y más palmítico que en el resto del año, en verano más MUFA que en primavera, en otoño más linoleico que en el resto del año, y en invierno más n-3 que en primavera (Tabla 1). En cabras prepúberes hemos observado que existe una disminución de la producción *in vitro* de embriones en otoño (4,7 %) respecto al invierno (15,8 %) y el resto de estaciones (Català et al., 2014). En la Tabla 2 en LF de prepúberes se ve que en otoño hay significativamente mayor porcentaje de AG n-6 (22,97 %) y menor AG n-3 (2,27 %) que en invierno (19,82 % y 4,93 %, respectivamente) y que en el resto de estaciones. Las cabras adultas, cuyos oocitos son más competentes para la producción *in vitro* de embriones, presentaron significativamente más n-3 y menos n-6 en LF que las prepúberes (resultados no presentados). En vacuno, altas concentraciones de linoleico (AG n-6) inhiben la maduración de los oocitos *in vitro* (Marei et al., 2010) mientras que el linoléico (AG n-3) mejora la competencia para producir embriones *in vitro* (Marei et al., 2009). Por tanto estos resultados nos podrían indicar la relación entre la competencia del oocito y la ratio entre n-6 y n-3 en LF. En la leche de cabra, Renna et al. (2012) observaron que los AG n-3 aumentaban tras la introducción de forraje fresco en la dieta, mientras que los AG n-6 variaban muy poco. Esto indicaría que una dieta rica en forraje fresco mejoraría la competencia oocitaria.

En conclusión, existe variación en los AG del LF a lo largo del año que no se corresponde totalmente a la observada en leche ni parece ser explicada por la dieta de cabras adultas. Por otro lado, los AG n-3 y n-6 del LF podrían explicar las diferencias estacionales en la competencia oocitaria observadas en cabras prepúberes. Es interesante realizar más estudios para entender el origen de las variaciones ya que los ácidos grasos influyen en el desarrollo embrionario y su uso podría aplicarse tanto en la reproducción como en la producción *in vitro* de embriones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bender et al. 2010. *Reprod.* 139(6): 1047-55.
- Castro-Gómez, et al. 2014. *J. Dairy Sci.* 97: 1-10.
- Catalá et al. 2014. *Reprod., Fert. & dev.* 27(1):216-217.
- Ceballos, et al. 2009. *J. Food Compos. Anal.* 22(4): 322-329.
- Childs, et al. 2008. *Theriog.* 70(4): 595-611.
- Czarniawska-Zajac, et al. 2006. *Polish J. food Nutr. Sci.* 15,: 51-55.
- Dunning, et al. 2014. *Reprod.* 148(1): R15-27.
- Leroy, et al. 2014. *Reprod. Domest. Anim.* 49: 353-361.
- Marei et al. 2009. *Biol. Reprod.* 81(6): 1064-1072.
- Marei et al. 2010. *Reprod.* 139(6): 979-988.
- Renna, et al. 2012. *Small Rumin. Res.* 108: 12-21.
- Romaguera, et al. 2011. *Theriog.* 76(1): 1-11.
- Sukhija, et al. 1988. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202-1206.
- Tsiplakou, et al. 2012. *Int. Dairy J.* 24(2): 87-92.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL 2011-23784.

Tabla 1. Cabras adultas. Porcentaje de ácidos grasos en líquido folicular en las diferentes estaciones del año.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Mirístico (C14:0)	1,16 ± 0,26	1,81 ± 0,16	1,85 ± 0,46	1,35 ± 0,28
Palmitico (C16:0)	31,72 ± 3,07 ^a	26,24 ± 0,75 ^b	25,93 ± 1,20 ^b	23,37 ± 0,79 ^b
Estearico (C18:0)	24,48 ± 0,96	21,89 ± 1,00	23,71 ± 0,76	24,31 ± 1,07
Oleico (C18:1n9)	20,83 ± 1,27	24,42 ± 1,30	22,32 ± 0,84	23,10 ± 0,84
Linoleico (C18:2n6)	8,93 ± 0,98 ^b	8,70 ± 0,59 ^b	12,05 ± 0,25 ^a	9,83 ± 0,42 ^b
Araquidónico (C20:4n6)	5,26 ± 0,68	5,02 ± 0,41	5,50 ± 0,42	5,45 ± 0,73
MUFAs	23,65 ± 1,48 ^b	28,68 ± 1,58 ^a	24,51 ± 1,23 ^{ab}	26,44 ± 0,88 ^{ab}
PUFAs	18,02 ± 2,42	18,93 ± 1,36	22,21 ± 0,79	22,28 ± 2,01
SFA	58,33 ± 3,30 ^a	52,78 ± 1,24 ^{ab}	53,28 ± 1,67 ^{ab}	51,30 ± 1,64 ^b
n-3	3,83 ± 0,92 ^b	4,82 ± 0,47 ^{ab}	4,66 ± 0,74 ^{ab}	7,00 ± 0,97 ^a
n-6	14,19 ± 1,57	13,71 ± 0,98	17,55 ± 0,35	15,28 ± 1,08

Los porcentajes están representados como X ± SEM. Los valores con diferente letra en la misma fila difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 2. Cabras prepúberes. Porcentaje de ácidos grasos en líquido folicular en las diferentes estaciones del año.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Mirístico (C14:0)	1,57 ± 0,07 ^b	1,68 ± 0,05 ^{ab}	1,74 ± 0,0 ^{ab}	2,00 ± 0,06 ^a
Palmitico (C16:0)	23,40 ± 0,30	23,14 ± 0,37	23,02 ± 0,17	24,21 ± 0,37
Estearico (C18:0)	17,28 ± 0,38	16,40 ± 0,48	16,18 ± 0,51	16,01 ± 0,58
Oleico (C18:1n9)	27,30 ± 0,62	28,12 ± 0,05	28,01 ± 0,60	26,70 ± 0,11
Linoleico (C18:2n6)	12,49 ± 0,62 ^{ab}	11,85 ± 0,50 ^{ab}	13,08 ± 0,31 ^a	10,67 ± 0,61 ^b
Araquidónico (C20:4n6)	8,46 ± 0,49	9,22 ± 0,46	9,89 ± 0,50	9,15 ± 0,67
MUFAs	31,68 ± 0,69	32,27 ± 0,17	33,07 ± 0,71	32,04 ± 0,27
PUFAs	25,11 ± 0,54	24,90 ± 0,17	25,24 ± 0,21	24,75 ± 0,13
SFA	43,21 ± 0,15 ^a	42,21 ± 0,24 ^{ab}	41,69 ± 0,61 ^b	43,22 ± 0,20 ^a
n-3	4,16 ± 0,32 ^a	3,83 ± 0,48 ^a	2,27 ± 0,23 ^b	4,93 ± 0,15 ^a
n-6	20,95 ± 0,44 ^b	21,07 ± 0,60 ^b	22,97 ± 0,30 ^a	19,82 ± 0,11 ^b

Los porcentajes están representados como X ± SEM. Los valores con diferente letra en la misma fila difieren significativamente (P<0,05).

FATTY ACID COMPOSITION IN FOLLICULAR FLUID OF ADULT AND PREPUBERTAL GOATS AND ITS EFFECT ON *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION (IVEP) AND DIET

ABSTRACT: The aim of this study was to analyse the fatty acid (FA) composition in follicular fluid (FF) of prepubertal and adult goats during different seasons in order to find a relationship with oocyte quality and the diet. FF was recovered by LOPU from adult goats and by follicular aspiration of ovaries from suckling prepubertal goats. FF was frozen (-80°C) and analysed by gas chromatography. The main FAs found in FF in both ages were palmitic, stearic, oleic and linoleic acids, which are different from FAs of goat milk. FF of adult goats showed seasonal variation although they were fed with the same diet all year. In our previous studies, we observed lower percentage of blastocysts produced *in vitro* in autumn (4.7 %) than in winter (15.8 %) in prepubertal goat oocytes. FF presented lower n-3 FA (2 % vs. 5 %) and higher n-6 FA (23 % vs. 20 %) in autumn than in winter. n-3 was low in milk in both seasons. In conclusion, the percentage of n-3 and n-6 can explain some differences in oocyte competence of prepubertal goats. FF composition of adult goat ovaries has some variation according to the season that is not explained by the diet.

Keywords: goats, fatty acids, oocytes, IVEP.

RENDIMIENTO DEL MOET APLICADO AL PROGRAMA DE SELECCIÓN DE LA RASA ARAGONESA DE UPRA-GRUPO PASTORES

Folch, J.¹, Alabart, J.L.¹, Lahoz, B.¹, Mozo, R.¹, Calvo, J.H.¹, Cocero, M.J.², Quintin, F.³, Sevilla, E.³, Hernández, M.³, Ramón, J.⁴, Olivera, J.⁵, Echegoyen, E.¹, Sánchez, P.¹, Fantova, E.⁶, Equipo Técnico Veterinario de UPRA-Grupo Pastores⁶, Jurado, J.J.⁷

¹CITA de Aragón. Av. de Montañana 930. 50059 Zaragoza; ²INIA Departamento de Reproducción. Ctra. La Coruña Km 5.9, Madrid; ³Centro de Mejora Ganadera. Av. de Movera s/n. Zaragoza; ⁴ITC-CeSyRO Conkal, Yucatán, Mexico; ⁵Fac. de Veterinaria, Ruta 3, km 363, Paysandú, Uruguay; ⁶Grupo Pastores. C^o de Cogullada s/n. Zaragoza; ⁷INIA Departamento de Genética. Ctra. de La Coruña Km 7.0 Madrid. jfolch@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La Unión de Productores de Raza Aragonesa (UPRA) es una de las organizaciones gestoras del Libro de la Raza. UPRA mantiene desde 1994 un Programa de Selección por prolificidad basado en el testaje de moruecos por su descendencia, utilizando la inseminación artificial para la conexión de los rebaños y para la difusión de la mejora. La evaluación genética se realiza mediante BLUP modelo animal (Jurado y Cea, 2000). Los machos a testar se eligen entre los hijos de las madres de valor genético (VG) más alto del núcleo de selección y de los mejores sementales de la población (115.000 ovejas y 42 machos en 2014). En ganaderías semiextensivas, la localización de dichos corderos es dificultosa, por problemas de identificación y porque se comercializan a una edad muy temprana. Por otro lado, el valor genético con alta fiabilidad de una oveja se conoce cuando ya tiene una edad avanzada, lo que limita las posibilidades de tener un descendiente a testar. Por todo ello, UPRA acordó con el CITA de Aragón en 1998 que los machos a testar fueran producidos por superovulación y transferencia de embriones (MOET; Multiple Ovulation and Embryo Transfer). En este trabajo se resumen el rendimiento obtenido en el programa MOET en el periodo 1998 a 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS

Donantes. Se eligen entre las 200 ovejas de VG y fiabilidad más altos, para lo cual deben tener un mínimo de tres partos controlados. Deben ser negativas a Brucelosis, Visna Maedi, Paratuberculosis, Agalaxia, ser de genotipo no-sensible a Scrapie y cumplir con el estándar racial. Las ovejas se trasladan al CITA, donde son superovuladas e intervenidas después de un periodo mínimo de 30 días de adaptación. Las ovejas de las que no se consigue un número suficiente de embriones son operadas nuevamente a un intervalo mínimo de 3 meses, para asegurar descendientes machos.

Transferencia de embriones. Las donantes se tratan con esponjas (40 mg FGA, Intervet hasta 2009; 30 mg FGA, CEVA; posteriormente) durante 13 días siendo sustituidas por otras nuevas a los 7 días de su colocación. Hasta 2007, se superovularon con 8,8 mg de oFSH (NIADDK-oFSH-17, OvagenTM) en 8 dosis decrecientes (2 x 1,32; 4 x 1,1 y 2 x 0,88 mg) a 12h de intervalo. Desde 2008, 5 días antes de la inserción de la esponja de FGA se aplican dos inyecciones de Cloprostenol (125 µg) separadas 8 días, con el objetivo de presincronizar las donantes. La segunda esponja se retira coincidiendo con la séptima inyección. A partir de 2008, se sustituyó el OVAGEN por 8 dosis de pFSH (Folltropin). La fecundación se realiza por inseminación intrauterina 51h después de retirar las esponjas, con semen diluido y refrigerado a 15°C (200 x 10⁹ espermatozoides/oveja), de machos selectos del Programa, localizados en Centro de Mejora Ganadera (CMG) del Gobierno de Aragón. Los emparejamientos se realizan evitando que machos y hembras tengan algún abuelo común, con el fin de evitar consanguinidad.

Los embriones se obtienen siete días después de retirar las esponjas por perfusión retrógrada desde la parte distal del cuerno a la unión útero-tubárica (Ramón et al., 1991) bajo anestesia general. A partir de 2008, la recogida se realiza con sonda Foley (sentido de lavado inverso) y los embriones se biopsian previamente a su transferencia para determinar el sexo, genotipo frente a scrapie (Dervishi et al., 2011) o presencia del alelo prolífico *FecX^R*. Los oocitos no fertilizados y embriones degenerados son eliminados. Se transfieren dos mórulas o blastocistos viables (grados 1 a 3; Overstrom, 1996) a receptoras tratadas con

FGA + eCG, asegurando que presenten al menos una ovulación. Los partos se controlan en jaulas individuales, realizando la identificación genética en todos los casos desde 2006. A la edad de 6 meses, los machos que cumplen el estándar racial y los controles sanitarios obligatorios ingresan en el CMG para ser testados.

Las diferencias de resultados en función del periodo, número de obtenciones y valor genético se analizaron mediante el procedimiento CATMOD de SAS (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se han localizado en las ganaderías 213 ovejas donantes que se superovularon entre 1 y 5 ocasiones, totalizando 331 tratamientos (1,55 tratamientos/donante en promedio) en 37 sesiones. El 20,5% de las perfusiones previstas no se realizaron por problemas de metritis, cuerpos lúteos regresados o ausencia de respuesta a la superovulación. Estos problemas afectaron a un 15% de las donantes (32) que no se pudieron perfundir. En las restantes 181 se realizaron un total de 263 perfusiones. De ellas, se recuperaron 3.076 estructuras embrionarias, el 20,9% de las cuales correspondieron a oocitos no fertilizados y el 12,9% a embriones no viables. En concreto, no se consiguió obtener ningún embrión viable (transferible) en 13 de las 181 donantes perfundidas (6,1% respecto del total de donantes). De las 168 restantes se obtuvieron 2.037 embriones viables. El rendimiento por donante fue de 11,3 embriones viables por cada una de las 181 donantes perfundidas, y de 12,1 por cada una de las 168 donantes que produjeron embriones transferibles. El rendimiento por cada tratamiento (n=331) fue de 6,2 embriones viables y 7,7 embriones viables por cada perfusión realizada (n=263).

De los 2.037 embriones viables obtenidos, se transfirieron en fresco 1.684 (el 82,7%), procedentes de 209 perfusiones realizadas en 152 donantes, mientras que los restantes se congelaron o se destinaron a otros usos.

Se obtuvo descendencia del 76,5% de las 213 donantes localizadas. Del 23,5% restante, no se obtuvo descendencia por no poderse perfundir (n=32), por no obtenerse embriones viables de las perfusiones (n=13) o por no haber nacimientos de los embriones transferidos (n=5). Nacieron 931 corderos (50,5% machos y 49,5% hembras). Es decir, se obtuvo un promedio de 6,1 corderos nacidos (CN) por donante perfundida (DP) y de 6,6 por donante que produjo embriones viables, en el total de los tratamientos. El número medio de corderos nacidos por cada perfusión fue de 4,5. Globalmente, la supervivencia embrionaria de los embriones transferidos en fresco fue del 55,3%.

Los resultados han variado en función de muchos factores. La experiencia y la mejora de la metodología se ha traducido en que el número de corderos nacidos por donante perfundida en su primera obtención tendió a aumentar a lo largo del tiempo: 3,6, 4,9 y 5,2 CN/DP en los periodos 1998-2001; 2002-2007 y 2008-2013, respectivamente (P<0,14). La repetición de las obtenciones ha complicado las cirugías debido a la formación de adherencias y ha disminuido el número de CN/DP: 4,7, 4,5, 1,8 y 2,0 en la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª+5ª obtenciones, respectivamente (P<0,0001). A raíz de estos resultados, a partir de 2008 se decidió no operar a las donantes más de dos veces.

La respuesta individual a los tratamientos ha sido muy variable. El número de embriones recogidos estuvo positivamente relacionado con el número de folículos de 2-3 mm al inicio del tratamiento con FSH, mientras que la presencia de grandes folículos (>6 mm) fue perjudicial (Folch et al., 2004). La supervivencia embrionaria (número de fetos/número de embriones transferidos) depende tanto de la calidad del embrión como de la receptora (Olivera et al., 2004). Así, la respuesta a la superovulación en el primer tratamiento de las donantes en que se lavaron ambos cuernos fue mayor en aquellas de VG alto: 16,7 vs. 13,6 CL en donantes de VG superior e inferior a 12,21, respectivamente (P<0,01). En las receptoras, el mayor número de CN se ha obtenido en las que presentan tasa de ovulación doble bilateral (Alabart et al., 2005).

El número medio de CN por cada perfusión ha sido de 4,5 con gran variación individual (de 0 a 20; D.S.: 4,2). En total, se han enviado 226 corderos al CMG para ser testados (48,1% de los nacidos). Los restantes fueron rechazados por no cumplir con el estándar racial.

A pesar de las limitaciones de la variabilidad individual de las donantes y de las exigencias morfológicas de los corderos producidos, el MOET mejora la presión de selección y el control

de descendencia, con la garantía sanitaria que ofrece la transferencia de embriones (IETS, 2011). La eficiencia de la transferencia de embriones aumentará próximamente con la identificación electrónica de donantes en las ganaderías, la elección de donantes por la tasa de AMH (Lahoz et al., 2015), la disponibilidad de FSH recombinante, etc. La biopsia de embriones por láser facilitará el sexado sin alterar los resultados (Alabart et al., 2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alabart et al., 2005. *Reprod. Fert. Dev.* 27(1): 162-163 • Alabart et al., 2015. *Reprod. Fert. Develop.* 27(1): 264. • Dervishi et al., 2011. *Reprod. Dom. Anim* 46: 999-1003 • Folch et al., 2004. *Reprod. Dom. Anim.*: 512. • IETS, 2011. *Manual IETS* • Jurado, J.J. y Cea, R., 2000. *OVIS* 68: 37-51 • Lahoz et al., 2015. *Reprod. Fert. Develop.* 27(1): 162-163 • Olivera et al., 2004. *Reprod Fert. Develop* 16: 514 • Overstrom, E.W., 1996. *Theriogenology* 45:3-16. • Ramón et al., 1991. *ITEA Vol Extra* 11(1):61-63. • SAS Institute Inc. 2012. *SAS OnlineDoc*® 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Agradecimientos: Financiación: Acuerdos de colaboración Oviaragón con CITA; INIA y CENSYRA. Financiación parcial a través del proyecto Ciencia Básica CONACYT 164592. Participación del Equipo Técnico Veterinario de UPRA-Grupo Pastores: Blasco M.E., Galeote A., Gallego B., Riaguas L., Roche A., Servera E. y Yarritu J.

Tabla 1. Resumen de resultados de embriones obtenidos, transferidos en fresco y corderos nacidos en el programa MOET

	Obtenidos			Transferidos	Corderos Nacidos		
	EE	NF	NV	ET	Totales	Machos	Machos a testar *
Donantes recogidas	14,4 (3076/213)	3,0 (643/213)	1,9 (397/213)	---	---	---	---
Donantes perfundidas	17,0 (3076/181)	3,6 (643/181)	2,2 (397/181)	11,1 (1684/152)	6,1 (931/152)	3,1 (470/152)	1,5 (226/152)
Perfusiones realizadas	11,7 (3076/263)	2,4 (643/263)	1,5 (397/263)	8,0 (1684/209)	4,5 (931/209)	2,2 (470/209)	1,1 (226/209)

EE: estructuras embrionarias (incluye NF y NV), NF: no fertilizados, NV: no viables, ET: embriones viables transferidos; * Entregados al CMG (Centro de Mejora Ganadera).

PERFORMANCE OF THE MOET APPLIED TO THE PROGRAM OF SELECTION OF THE RASA ARAGONESA BREED OF THE UPRA-GRUPO PASTORES

ABSTRACT: In the selection scheme to improve prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed, the males to be tested are produced by a MOET programme, using the ewes of higher genetic value as donors. In the period 1998-2013, a total of 331 flushings have been performed in 213 donor ewes. Ewes were treated with FGA sponges and superovulated with 8.8 mg of oFSH (Ovagen) in eight decreasing doses (2 x 1.32; 4 x 1.1 and 2 x 0.88 mg) at 12h intervals. Since 2008, Ovagen was replaced by Folltropin. Intrauterine insemination (200×10^6 spermatozoa/ewe) with fresh semen from selected rams was carried out 51h after sponge withdrawal. A total of 3076 embryos were obtained (2037 morphologically viable), 1551 of which were fresh-transferred to FGA+eCG synchronized recipients (two morulae or blastocysts per recipient). A total of 931 lambs were born (470 males), 226 of which were suitable to be tested. The efficiency of the MOET program has been influenced by many factors, such as the improvement of the techniques, the number of flushings per donor, the genetic value of the donor or the ovulation rate of the recipient. The importance of MOET in the selection scheme is discussed.

Keywords: ovine; embryo transfer; genetic program

ELECCIÓN DE LAS MEJORES OVEJAS DONANTES DE EMBRIONES MEDIANTE LA DETERMINACIÓN PLASMÁTICA DE SU AMH (HORMONA ANTI-MÜLLERIANA)

Lahoz B., Alabart J.L., Sánchez P., Echegoyen E., Folch J.

CITA de Aragón. Av. de Montañana 930. 50059 Zaragoza. blahozc@aragon.es

INTRODUCCIÓN

Desde 1998 en el CITA se utiliza la tecnología MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) para la producción de moruecos a testar dentro del Programa de selección por prolificidad de UPRÁ-Grupo Pastores. Uno de los principales factores que limita el rendimiento de la técnica es la gran variabilidad individual en la respuesta de las donantes de embriones a los tratamientos de superovulación, de manera que más de un 20% presenta falta de respuesta al tratamiento superovulatorio, cuerpos lúteos regresados o algún otro tipo de problema reproductivo en el momento de la recuperación (Folch et al., 2009 y 2015). Poder seleccionar las mejores donantes antes de iniciar el tratamiento supondría una mejora del rendimiento de la técnica, así como un considerable ahorro económico, de mano de obra y una reducción del número de animales utilizados en el procedimiento. Para ello en el presente trabajo nuestro objetivo fue tratar de identificar las mejores donantes utilizando como predictor de la respuesta ovárica la hormona anti-Mülleriana (AMH). Esta hormona es producida en la hembra exclusivamente a nivel del ovario y ha demostrado ser un buen predictor de la población folicular ovárica capaz de responder a las gonadotropinas en varias especies (revisado por Monniaux et al., 2013). En estudios previos llevados a cabo en el CITA observamos que también en ovino, puede ser un buen predictor del número de folículos sensibles a gonadotropinas. En dicho estudio observamos que por cada 100 pg/ml que aumentaba su concentración plasmática se obtenían 5,1 folículos adicionales puncionables en cada sesión de LOPU (Laparoscopic ovum pick up), por lo que era posible identificar las ovejas que mejor responden en términos de folículos puncionables (Lahoz et al., 2014). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de la AMH como predictor de las mejores ovejas donantes de embriones dentro de un programa MOET.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las donantes de embriones fueron ovejas adultas de raza Rasa Aragonesa seleccionadas en las ganaderías como madres de los futuros sementales a testar del esquema. Se realizaron dos sesiones MOET con un total de 18 ovejas, que fueron sometidas a una (n=12) o dos (n=6) sesiones, de manera que se dispone de un total de 24 recuperaciones. Cada donante recibió una esponja de FGA (acetato de fluorogestona; Sincropart 30 mg, CEVA Animal Health SA, Barcelona, España), que fue reemplazada por una nueva 6 días después (T-4). Cuatro días más tarde (T0), se aplicó la primera inyección de FSH porcina (Folotropin-V, Minitub Ibérica SL, Tarragona, España) de un tratamiento de superovulación consistente en 350 UI de FSH administradas en 8 dosis decrecientes. Se tomaron muestras de sangre para la determinación de AMH a T-4 y T0, utilizando tubos de heparina de litio. Las donantes se inseminaron 51 horas después de la retirada de la esponja. Ocho días tras la retirada de la esponja se determinó la tasa de ovulación mediante endoscopia y bajo anestesia general y se recuperaron los embriones mediante una sonda Foley (Foleycath, WRP, Sepang, Malaysia). Después de la evaluación morfológica de los embriones (IETS Manual, 4th edition), se transfirieron dos embriones (mórulas o blastocistos) de grado 1 y/o 2 a cada receptora previamente sincronizada. Por último se controlaron los partos y se confirmó la filiación mediante análisis genético.

Las concentraciones plasmáticas de AMH se determinaron utilizando un kit comercial ELISA de AMH para la especie equina (AnshLab, Webster, TX, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 27,8 pg/ml, y el coeficiente de variación intra-ensayo fue del 4,8%.

Las correlaciones entre la concentración de AMH de cada animal y el número de cuerpos lúteos (CL), embriones recuperados (ER), embriones viables (EV) y corderos nacidos (CN) por oveja donante se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La normalidad de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre medias se calcularon mediante ANOVA de una vía. Se utilizó el software SPSS Statistics v.17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de donantes con fallos ovulatorios o de fertilización fue del 16,7% (4/24). Estos fallos incluyen fallos de respuesta superovulatoria (≤ 2 CLs; $n=3$) y fallos totales de fertilización ($n=1$). El porcentaje de embriones recuperados fue del 57,5% (168/292), observándose un 8,3% de fallos totales de recuperación en ovejas que habían superovulado ($n=2$). Esas dos ovejas no se tuvieron en cuenta en el análisis.

Las concentraciones plasmáticas de AMH a T-4 y al inicio del tratamiento (T0) estuvieron altamente correlacionadas entre sí ($r=0,95$; $p<0,001$; Figura 1a). Esto parece indicar que se podría utilizar indistintamente una u otra como predictores de respuesta ovárica, en función de las posibilidades de muestreo. La concentración de AMH a T0 estuvo altamente correlacionada con la tasa de ovulación ($r=0,70$; $p<0,001$; Figura 1b), observándose una alta variabilidad individual en todas las variables estudiadas (Tabla 1). Las correlaciones entre la AMH y el resto de variables no alcanzaron la significación estadística (ER: $r=0,33$; EV: $r=0,23$; CN: $r=0,15$). Cuando únicamente se tuvieron en cuenta las donantes que no habían sido previamente sometidas a ninguna sesión de MOET, la correlación con la tasa de ovulación fue todavía mayor ($r=0,82$; $p<0,001$), aunque tampoco se alcanzó la significación estadística con el resto de variables (ER: $r=0,29$; EV: $r=0,31$; CN: $r=0,30$). Además de con la AMH, la tasa de ovulación también se correlacionó con el número de embriones recuperados ($r=0,69$; $p<0,001$), embriones viables y corderos nacidos (ambos $r=0,57$; $p<0,01$). Estos resultados parecen evidenciar que mejorar la tasa de ovulación de las donantes mediante la selección por AMH podría tener una repercusión positiva sobre el resto de variables de MOET. Además, sería necesario revisar el sistema de lavado utilizado, ya que los porcentajes de recuperación de embriones de este trabajo son sensiblemente inferiores a los descritos en trabajos anteriores (1998-2001: 72,2%; 2002-2007: 82,8%; Folch et al., 2009). En el presente trabajo esto podría estar afectando negativamente a las correlaciones entre la AMH y el resto de variables de MOET, más allá de la tasa de ovulación.

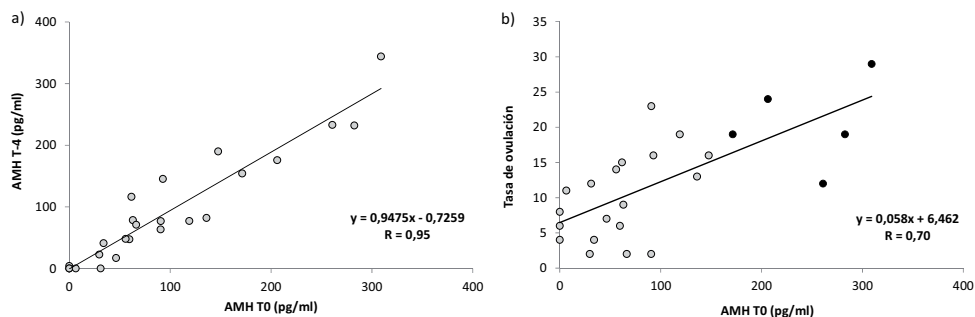


Figura 1. Correlación entre la concentración plasmática de AMH a T-4 y a T0 (a) y entre la AMH a T0 y la tasa de ovulación (b). Los círculos negros representan las donantes con concentraciones de AMH por encima de 169 pg/ml (cut-off).

En un trabajo previo (Lahoz et al., 2014) calculamos un punto de corte (cut-off) a partir del cual poder seleccionar las ovejas que mejor respondían a un tratamiento de estimulación con FSH, en ese caso dentro de un programa de LOPU. Cuando se aplicó dicho cut-off a las donantes del presente trabajo, el grupo de AMH ALTA (≥ 169 pg/ml) presentó 10,8 ovulaciones adicionales, 3,5 embriones recuperados, 3,3 embriones viables y 2 corderos extra respecto al grupo de AMH BAJA (Tabla 1). No obstante, en estas condiciones la aplicación del cut-off solo permitió seleccionar 5 donantes, y no se alcanzó la significación estadística en todas las variables. Si bien el trabajo anterior se realizó con otro kit comercial, y los protocolos de estimulación con FSH son diferentes de los de superovulación utilizados en este trabajo, los resultados ponen de manifiesto la utilidad de la AMH como predictor de la respuesta ovárica en diversas condiciones. No obstante sería necesario disponer de más datos para poder recalculer un cut-off óptimo para las condiciones de los programas MOET.

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de AMH (pg/ml) a T-4 y a T0 y variables relacionadas con MOET por oveja y por sesión.

	AMH T-4	AMH T0	TO	ER	EV	CN
Total						
Media±EE	93±18	98±18	12,1±1,5	7,6±1,2	6,0±1,1	4,5±0,9
Rango	(0-344)	(0-309)	(2-29)	(0-17)	(0-15)	(0-13)
ALTA						
Media±EE	228±33 ^a	246±25 ^a	20,6±2,8 ^c	10,5±2,6	8,7±3,1	6,0±2,5
Rango	(154-344)	(171-309)	(12-29)	(4-16)	(3-15)	(0-11)
BAJA						
Media±EE	57±12 ^b	60±10 ^b	9,8±1,4 ^d	7,0±1,3	5,4±1,1	4,0±0,9
Rango	(0-190)	(0-148)	(2-23)	(0-17)	(0-14)	(0-13)

Total: todas las ovejas (n=24); ALTA: ovejas con AMH T0≥169 pg/ml (n=5); BAJA: ovejas con AMH T0<169 pg/ml (n=19).

Comparación ALTA-BAJA: dentro de una misma columna, a,b: p<0,001; c,d: p<0,01.

En conclusión, las concentraciones de AMH medidas en el plasma sanguíneo antes del tratamiento con FSH podrían utilizarse para predecir el número de ovulaciones por oveja donante, y así poder mejorar la eficiencia de los programas MOET. Poder instaurar un protocolo de determinación de la concentración de AMH en las ganaderías antes de seleccionar y trasladar las ovejas donantes permitiría una considerable mejora de la eficiencia y un importante ahorro económico. No obstante, son necesarios más datos para poder calcular la repetibilidad individual entre sesiones y tratar de ver si existe una correlación adicional con el resto de variables del programa MOET y con la calidad de los embriones que pudiera derivar de una mayor calidad de los oocitos de origen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Folch et al., 2009. 60th Annual Meeting EAAP, p. 275.
- Folch et al., 2015. XVI Jornadas Prod. Anim. AIDA.
- IETS Manual, 4th edition.
- Lahoz et al., 2014. Theriogenology 81: 347-357.
- Monniaux et al., 2013. Reprod Fertil Dev 25: 1-16.

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA2011-00128) y CDTI (IDI-20120768).

ELECTION OF THE BEST EMBRYO DONOR EWES BY DETERMINING THEIR PLASMA AMH (ANTI-MÜLLERIAN HORMONE)

ABSTRACT: Anti-Müllerian hormone (AMH) has been demonstrated to be a good predictor of the ovarian response to gonadotropins in several mammalian species. We aimed to test its usefulness in a MOET program in sheep, where the performance is widely known to be low mainly due to variable ovarian responses to FSH treatments. Two plasma AMH samples were obtained from each ewe and session at the time of the first FSH injection (T0) and 4 days before (T-4), and were analyzed using the AMH equine ELISA kit (AnshLab, Webster, TX, USA). The AMH concentrations as well as the other MOET-related variables were highly variable between individuals. The AMH at T0 was highly correlated with the total number of CL ($r=0.70$; $p<0.01$), although significance was not attained with the other MOET-related variables. The use of a previous determined cutoff (169 pg/ml) to detect high-responding ewes gave rise to an increase in ovulation rate of +10.8 ($p<0.01$), and to 3.5 additional recovered embryos and +2 extra lambs born per donor ewe and session (both $p>0.05$) when compared with low-responding ewes. In conclusion, plasma AMH concentrations measured before the FSH treatment could be used to predict the ovulatory response of donor ewes, and so to improve the efficiency of MOET programs. More data are necessary to assess the individual repeatability as well as the relationship of AMH with other MOET-related variables, in order to establish a reliable protocol to be implemented in farms before selecting and moving the donor ewes.

Keywords: anti-Müllerian hormone, embryo transfer, sheep, superovulation

Genética

EFFECTO DE LA ALIMENTACION CON LINO Y ALGAS SOBRE EL DESARROLLO DEL TEJIDO GRASO Y LA EXPRESIÓN DE GENES ADIPOGÉNICOS Y LIPOGÉNICOS DE CORDEROS

Urrutia, O., Soret, B., Mendizabal, J. A., Purroy, A. y Arana, A.

¹ETSIA, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. olaia.urrutia@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

Las características sensoriales de la carne (jugosidad, sabor y aroma) así como con sus propiedades nutricionales están estrechamente relacionadas con la composición y la cantidad de la grasa. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga (AGPI-CL), en especial el DHA (22:6n-3) y el EPA (20:5n-3), se consideran beneficiosos para la salud, por lo que es de interés aumentar su contenido en la carne de cordero. La utilización de semillas o aceites ricos en ácido α -linolénico (ALA) enriquece la carne en AGPI n-3 y podría promover la síntesis endógena de sus derivados de cadena larga (DHA y EPA). Otra de las estrategias nutricionales consiste en la inclusión de fuentes ricas en estos ácidos grasos, como son las algas, en la dieta de los animales.

La cantidad de grasa de la carne está estrechamente relacionada con el desarrollo del tejido adiposo, el cual se produce por el aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o el aumento del número de estos (hiperplasia). La adipogénesis es un proceso regulado por distintos factores de transcripción (FT), como el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*PPARG*) y la proteína de unión a la secuencia CAAT (*CEBPA*), también encargados de mantener el fenotipo de los adipocitos maduros.

El objetivo del estudio fue analizar el efecto de la inclusión de lino y algas en la dieta sobre el desarrollo del tejido graso, la expresión de los FT adipogénicos y de los genes relacionados con la formación de los AGPI-CL, en los tejidos intramuscular (IM) y subcutáneo (SC) de corderos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 33 corderos machos de raza Navarra destetados con $16,3 \pm 0,3$ kg de peso vivo (PV) y asignados al azar a uno de los siguientes grupos: control (**C**; pienso comercial con cebada y soja); **L** (pienso con un 10% de semilla de lino); **LA** (pienso con un 5% de semilla de lino y 3,7% de algas). Tras el sacrificio (26-27 kg PV), se tomaron muestras de músculo *longissimus dorsi* (IM) y depósito SC. Se determinó el número y diámetro de los adipocitos y la actividad de la enzima G3PDH (Soret et al., 1998). Tras la extracción de ARN y síntesis del ADNc mediante kits comerciales, se analizó por PCR cuantitativa a tiempo real (SYBR Green) la expresión de los siguientes genes: *PPARG*, *CEBPA*, factor 1 de unión a elementos reguladores del colesterol (*SREBF1*), desaturasas 1 y 2 de ácidos grasos (*FADS1* y *FADS2*) y elongasa 5 (*ELOVL5*); como control endógeno se usó el gen β -*actina* (Urrutia et al., 2015). La expresión relativa de los genes se calculó utilizando el método $\Delta\Delta C_T$ y el análisis estadístico se realizó con el programa REST© algorithm. Los otros parámetros estudiados se analizaron mediante ANOVA de un factor y la comparación de medias se realizó con el Test de Tukey (SPSS v. 22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados productivos, que han sido presentados anteriormente (Arana et al., 2011), indicaron que la inclusión de lino en la dieta no afectaba a las características de crecimiento de los corderos; sin embargo, los corderos alimentados simultáneamente con lino y algas presentaron una menor GMD y una mayor edad a un mismo peso de sacrificio ($P < 0,001$). La cantidad de grasa IM y SC fue similar en los tres lotes ($P > 0,05$). También en trabajos anteriores (Insausti et al., 2011) se pudo comprobar que los corderos de los lotes L y LA presentaron un aumento en ALA, 18:1n11 y EPA en ambos tejidos, aunque el DHA sólo aumentó en los corderos del lote LA ($P < 0,001$).

En la Tabla 1 se muestra el número y tamaño de los adipocitos del tejido IM, no habiendo diferencias entre los tres grupos. Además, los histogramas de distribución de frecuencias en función del tamaño de los adipocitos muestran que en los tres lotes hay una distribución asimétrica, con un predominio muy marcado de adipocitos de pequeño tamaño (20-30 μ m; Figura 1). Esto podría estar indicando una intensa hiperplasia en el depósito IM de estos corderos y estaría de acuerdo con el principio de que el tejido IM es de desarrollo tardío

(Robelin, 1986). A pesar de que el ALA, 18:1n-1 y el EPA aumentaron en el tejido IM en los corderos de los lotes L y LA (Insausti et al., 2011), no hubo diferencias significativas en el contenido de la grasa IM. Esto concuerda con la ausencia de variación entre lotes en el número y tamaño de los adipocitos, en la actividad de la G3PDH, implicada en la acumulación de los triglicéridos, y en la expresión de *PPARG*, *CEBPA* y *SREBF1* (Tabla 2). En el tejido SC, aunque no hubo diferencias en el número de adipocitos, el diámetro de los mismos en los lotes L y LA tendió a aumentar con respecto al control ($P = 0,057$). Los histogramas muestran una distribución bimodal del tamaño de los adipocitos, lo que podría indicar la manifestación simultánea tanto de la hiperplasia como de la hipertrofia de los adipocitos. Además, parece que se produjo una mayor intensidad de la hipertrofia en los lotes L y LA, destacando el lote LA, probablemente debido a que la edad de sacrificio de estos corderos fue mayor. Por otro lado, se observó un aumento de la actividad de la G3PDH ($P < 0,05$) y de la expresión de los FT *PPARG* y *CEBPA* ($P < 0,001$). Por tanto, el mayor flujo de AG exógenos al tejido SC en los corderos de los lotes L y LA podría haber causado una activación del proceso de lipogénesis y síntesis de triglicéridos, mediada por *PPARG* y *CEBPA*, que habría resultado en una mayor hipertrofia de los adipocitos.

La expresión de los genes implicados en la síntesis de AGPI-CL (*FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5*) mostró una respuesta diferente en los tejidos estudiados al incluir AGPI n-3 en la dieta. En el tejido SC, no hubo variación en la expresión de ninguno de ellos, mientras que en el tejido IM se observó una inhibición de la *FADS1* y *FADS2* ($P < 0,001$), lo que concuerda con resultados de otros autores (Hiller et al., 2011). La respuesta observada en el tejido IM podría tener como fin mantener constante la composición de AG de las membranas celulares en orden a no alterar sus propiedades (y por tanto su función). A esto se suma que los adipocitos IM tienen menor capacidad lipogénica y de acumulación de AG (Smith y Crouse, 1984). Cabe destacar que la expresión del gen *FADS2* disminuyó en el tejido IM en el lote LA con respecto al lote L ($P = 0,001$), lo cual indicaría que una mayor disponibilidad de EPA y DHA, productos finales de la cadena de formación de AGPI-CL, habría causado una mayor inhibición en este gen que la producida por el precursor ALA (dieta L).

En conclusión, se puede afirmar que, como respuesta a la inclusión de lino y algas en la dieta, la grasa IM del músculo *longissimus dorsi* y el tejido adiposo SC mostraron diferencias en la distribución del tamaño de los adipocitos, actividad de la enzima G3PDH, FT adipogénicos y genes implicados en la síntesis de AGPI-CL, indicando que el desarrollo del tejido graso presentaría rasgos específicos en cada uno de los depósitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arana, A. 2011. AIDA. XVI Jorn. Prod. Animal. II: 637-639.
- Hiller, B. 2011. Lipids. 46: 557-567.
- Insausti, K. 2011. AIDA. XVI Jorn. Prod. Animal. II: 640-642.
- Robelin, J. 1986. J. Livest. Prod. Sci. 14: 349-364.
- Smith, S. B. 1984. J. Nutr. 114: 792-800.
- Soret, B. 1998. Small Rum. Res. 29: 103-112
- Urrutia, O. 2015. Small Rum. Res. 123: 204-211.

Tabla 1. Número y diámetro de los adipocitos y actividad enzimática de la G3PDH de corderos en función de la dieta (C: control; L: 10% de lino; LA: 5% de lino + 3,7% de algas).

	C	L	LA	EEM	P-valor
Número de adipocitos, 10⁶					
Intramuscular	69,0	96,5	73,6	20,9	0,680
Subcutáneo	55,9	55,5	43,9	11,1	0,696
Diámetro de los adipocitos, μm					
Intramuscular	32,7	31,4	32,6	1,39	0,777
Subcutáneo	55,2	64,5	67,6	3,00	0,057
G3PDH, $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 10^6$ adipocitos					
Intramuscular	848	914	1112	202	0,668
Subcutáneo	155 ^b	263 ^a	282 ^a	33	0,026

Tabla 2. Expresión de genes adipogénicos y lipogénicos en el tejido intramuscular (IM) y subcutáneo (SC) de corderos en función de la dieta (L: 10% de lino; LA: 5% de lino + 3,7% de algas).

Gen	Tejido	Lote	Expresión ¹	I.C. (95%)	P-valor	Result. ²
<i>PPARG</i>	IM	L / LA	0,98 / 0,87	0,26-3,75 / 0,17 - 6,32	0,96 / 0,77	= / =
	SC	L / LA	7,42 / 10,55	2,02-38,5 / 0,59-122,6	0,01 / 0,03	↑ / ↑
<i>CEBPA</i>	IM	L / LA	0,54 / 0,54	0,16-2,87 / 0,16-2,87	0,12 / 0,10	= / =
	SC	L / LA	1,94 / 8,13	1,02-3,87 / 0,99-31,67	0,02 / 0,04	↑ / ↑
<i>SREBF1</i>	IM	L / LA	1,12 / 0,44	0,16-5,53 / 0,07-2,73	0,81 / 0,11	= / =
	SC	L / LA	1,01 / 1,70	0,42-3,04 / 0,13-10,73	0,98 / 0,52	= / =
<i>FADS1</i>	IM	L / LA	0,11 / 0,11	0,02-0,67 / 0,02-0,76	0,001 / 0,001	↓ / ↓
	SC	L / LA	2,13 / 0,26	0,34-36,90 / 0,02-2,53	0,61 / 0,09	= / =
<i>FADS2</i>	IM	L / LA	0,31 / 0,13	0,08-0,81 / 0,04-0,31	<0,001 / <0,001	↓ / ↓
	SC	L / LA	3,15 / 0,42	0,19-47,28 / 0,06-2,65	0,24 / 0,29	= / =
<i>ELOVL5</i>	SC	L / LA	3,50 / 0,30	1,00-13,76 / 0,10-1,02	0,10 / 0,20	= / =

¹Cambio de expresión (FC) relativa al grupo control.²↑ = sobreexpresado; ↓ = subexpresado.

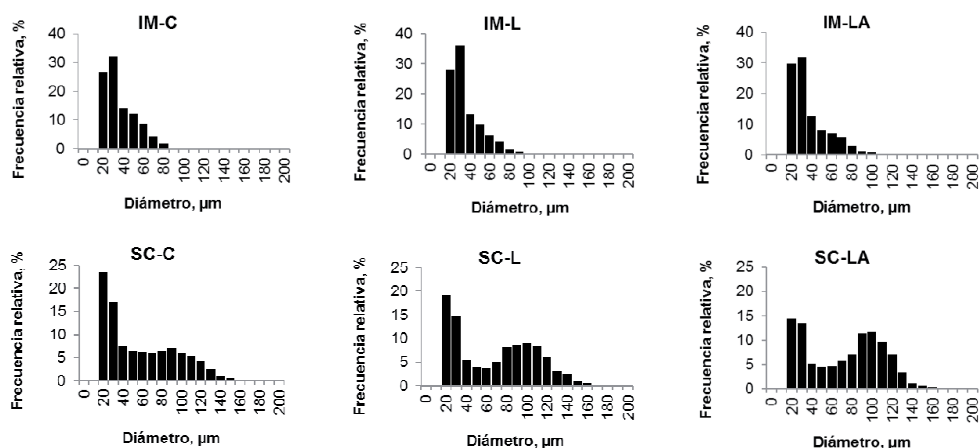


Figura 1. Distribución del tamaño de adipocitos del tejido IM y SC de corderos alimentados con diferentes dietas (C: control; L: 10% de lino; LA: 5% de lino + 3,7% de algas).

EFFECT OF DIETARY LINSEED AND ALGAE SUPPLEMENTATION ON ADIPOSE TISSUE DEVELOPMENT AND ADIPOGENIC AND LIPOGENIC GENE EXPRESSION

ABSTRACT: This work aimed to study the effect of linseed (rich in 18:3n-3) or algae (rich in EPA and DHA) supplementation on adipose tissue development and the expression of *PPARG*, *CEBPA* and *SREBF1*, *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5* in intramuscular (IM) and subcutaneous (SC) adipose tissues (AT). Thirty tree male Navarra breed lambs were assigned to three groups: control, C (barley and soya); L (C diet+10% linseed) and LA (C diet+5% linseed+3.7% algae). Although the contents of 18:1t11, 18:3n-3 and EPA in IM AT in L and LA groups increased ($P < 0.001$), there were not differences in IM fat content, which is consistent with no variations in adipocyte number and diameter, G3PDH activity or *PPARG*, *CEBPA* and *SREBF1* expression. Conversely, the higher FA fluxes reaching SC tissue (stated by an increase in 18:1t11, 18:3n-3 and EPA) could enhance the lipogenesis process and triglyceride synthesis mediated by higher *PPARG* and *CEBPA* expression and higher G3PDH activity. mRNA levels of *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5* genes did not change in the SC tissue whereas *FADS1* and *FADS2* decreased in the IM tissue in L and LA. To conclude, IM and SC AT showed a tissue-specific response to n-3 PUFA supplementation.

Keywords: linseed, algae, gene expression, lambs

PUESTA A PUNTO DE MARCADORES MIO Y FIBROGÉNICOS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN VACUNO DE RAZA PIRENAICA

Martínez Del Pino, L., Urrutia, O., Arana, A., Alfonso, L., Mendizábal, J.A. y Soret, B. ETSIA, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. lara.martinez@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

El músculo, la grasa, el tejido conectivo y el hueso, es decir los componentes principales de la canal, proceden en gran medida de células precursoras comunes (Du *et al.*, 2013). Cada vez existen más evidencias que indican que el desarrollo del tejido adiposo intramuscular (IM) está muy ligado al de las fibras musculares. Aunque los mecanismos implicados son todavía ampliamente desconocidos, se considera que puede haber una priorización o competición por la hipertrofia celular en estos tejidos que estaría mediada por factores adipogénicos, miogénicos y fibrogénicos y también por determinadas mioquinas y adipocinas (Bonnet *et al.*, 2010).

Un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del tejido adiposo IM en el ganado vacuno podría ayudar a identificar estrategias que permitan modificar la proporción entre músculo y grasa, mejorando la calidad de la carne de vacuno y adaptando este producto a las demandas del consumidor. Una herramienta que puede permitir la identificación de factores implicados en el desarrollo del tejido IM, analizando diferencias en la cantidad de RNA mensajero expresado bajo distintas hipótesis experimentales, es la cuantificación de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Por ello, el objetivo de este trabajo es la puesta a punto de marcadores miogénicos y fibrogénicos mediante RT-qPCR con el fin de estudiar su posible relación con el desarrollo de la grasa IM en terneros de raza Pirenaica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los marcadores seleccionados, en función de su implicación en los procesos celulares y metabólicos de interés, fueron: *Myogenic factor 5 (Myf5)*, *Myogenic differentiation 1 (MyoD1)* y *Myogenin (MyoG)*, implicados en procesos miogénicos; *Myostatin (MSTN)* regulador negativo del desarrollo muscular; *Fibronectin 1 (FN1)*, *Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)*, *Fibroblast growth factor 2 (FGF2)* y *Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1)*, relacionados con la fibrogénesis (Buckingham, 2001; Chen *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2013; Gosh *et al.*, 2005).

Se seleccionaron también cinco genes de referencia: *β-actina*, *CNL3*, *RFLPO*, *PPIA* y *TOP2B*, utilizados en numerosos estudios debido a la estabilidad de su expresión en diferentes condiciones como variaciones en edad, sexo del individuo o tipo de tejido (Bonnet *et al.*, 2013; Waters *et al.*, 2009).

Se extrajo ARNm de muestras de los músculos *Masseter*, *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* obtenidas de cuatro terneros de raza Pirenaica sacrificados con pesos comerciales. Posteriormente se procedió a la síntesis de ADNc, utilizando en ambas etapas kits comerciales.

Se eligieron, bien a través de fuentes bibliográficas bien por diseño propio usando el programa Primer3, cebadores que amplificaban una región de entre 100 y 200 pb, aproximadamente, para cada uno de los marcadores. Los amplicones obtenidos se clonaron en el vector comercial pGEMTeasy (Promega) y los vectores con el inserto se extrajeron y diluyeron de forma seriada en ARNt para después amplificarlos por medio de RT-qPCR (SYBR Green). Se calcularon las eficiencias de amplificación de cada cebador con los datos de las curvas estándar siguiendo el método descrito por Rasmussen *et al.* (2001).

Por otro lado, con los datos de amplificación de los cinco genes de referencia se seleccionaron aquellos más estables mediante el uso de RefFinder (Jacob *et al.*, 2013), un programa que utiliza los algoritmos disponibles para los métodos geNorm, Normfinder, Bestkeeper y el método comparativo ΔCt.

Finalmente, se comprobó la efectividad de cada pareja de cebadores utilizando pools del ADNc obtenido de muestras de los mismos terneros y músculos y se calculó el nivel de expresión relativo mediante el método $\Delta\Delta C_T$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores medios de Ct, pendientes, coeficientes de determinación (R^2) y eficiencia de los cebadores seleccionados se muestran en la Tabla 1. Las eficiencias obtenidas son todas cercanas a 2 y los índices de determinación superiores a 0,97, indicando que la cuantificación de la expresión de los marcadores cumple los criterios para ser considerada correcta (Taylor *et al.*, 2010).

En cuanto a los genes de referencia, la Tabla 2 muestra el orden de estabilidad de cada gen. El programa RefFinder examina y asigna un orden de estabilidad a cada gen basado en la media geométrica del orden establecido por cada uno de los cuatro métodos mencionados. El gen que mostró valores más adecuados según este parámetro fue *TOP2B*. Entre los otros genes, *CLN3* presentaba el siguiente mejor valor de estabilidad, mientras que el gen de la β -actina estaba en tercera posición. Autores como Vandesompele *et al.*, (2002) proponen que el uso de un solo gen de referencia es insuficiente por lo que recomiendan el uso de al menos dos. En este caso, y a pesar de que *CLN3* mostraba mayor estabilidad que la β -actina, se optó por esta última además del *TOP2B*, en orden a realizar comparaciones más aproximadas con otros experimentos, ya que este gen ha sido ampliamente utilizado.

Los resultados obtenidos con los pools de ADNc en el experimento preliminar para comprobar la efectividad de los marcadores, mostraron que en el músculo *Masseter* los niveles de expresión de algunos marcadores miogénicos eran menores en relación con los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* (Figura 1). Atendiendo a los valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$, *MyoD1* se expresa 9 veces más y *MSTN 5* y 3,5 veces más en el *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* que en el *Masseter*, respectivamente. También para *Myf5* y *MyoG* se observa una menor expresión en este músculo mientras que por ejemplo *FN1*, marcador fibrogénico, se expresa 4 y 3 veces más en el *Masseter* y *Longissimus* que en el *Semitendinosus*, respectivamente. Las diferencias observadas podrían estar relacionadas con las características de los músculos, ya que mientras el *Masseter* presenta predominancia de fibras lentas de tipo I y metabolismo oxidativo, *Longissimus* y *Semitendinosus* tienen una mayor proporción de fibras rápidas tipo IIA y metabolismo más glicolítico (Picard *et al.*, 1996), relacionándose éste con un mayor desarrollo muscular y una reducida deposición de grasa intramuscular (Hocquette *et al.*, 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buckingham, M. 2001. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 440-448.
- Bonnet *et al.*, 2010. *Animal* 4 (7), 1093–1109
- Bonnet *et al.*, 2013. *Animal*. 7: 1344-1353
- Chen *et al.*, 2005. *Neurology* 65: 856-834
- Duarte *et al.*, 2013. *J. Anim. Sci.* 91: 2938-2946
- Du *et al.*, 2013. *J. Anim. Sci.* 91: 1419–1427
- Gosh *et al.*, 2005. *Cardiovasc. Pathol.* 14: 28-36
- Hocquette *et al.* 2010 *Animal* 4 (2), 303-319.
- Jacob *et al.*, 2013. *Plos One* 8: e59180
- Picard *et al.*, 1996 *BAM* 6(5): 361-372
- Rasmussen *et al.*, 2001. *Quantification on the LightCycler*. Pag. 21-34
- Taylor *et al.*, 2010 *Methods*. 50: S1-S5
- Vandesompele *et al.*, 2002. *Genome Biol.* 2002. 3: 34.1- 34.11
- Waters *et al.*, 2009. *Anim. Sci.* 87: 244-52.

Tabla 1. Marcadores y genes de referencia seleccionados.

Gen	Nº acc. GenBank	pb	Ct Promedio	Pendiente	R ²	Eficiencia
<i>Myf5</i> ¹	NM_174116.1	220	20,04	-3,32	1	2,00
<i>MyoD1</i>	NM_001040478.2	72	26,47	-3,34	0,99	1,99
<i>MyoG</i>	NM_001111325.1	67	22,89	-3,29	1	2,02
<i>GDF8</i> ¹	AF320998.1	238	20,71	-3,31	1	2,00
<i>FN1</i>	NM_001163778.1	149	22,97	-3,07	1	2,11
<i>FGFR1</i>	NM_001110207.1	166	23,73	-3,35	1	1,99
<i>FGF2</i>	NM_174056.3	165	18,93	-3,18	0,97	2,06
<i>TGFβ1</i>	NM_001166068.1	147	23,80	-3,21	1	2,05

<i>β-actina</i>	BC142413	140	21,28	-3,36	0,98	1,98
<i>CNL3</i>	NM_001075174.2	62	29,32	-3,15	0,97	2,07
<i>RFLPO</i>	NM_001012682.1	227	21,68	-3,18	0,99	2,06
<i>PPIA</i>	XM_001252497	116	23,79	-3,25	0,99	2,03
<i>TOP2B</i>	XM_001254709.4	62	25,98	-3,02	0,99	2,14

¹ cebadores de diseño propio

Tabla 2. Orden de estabilidad para los genes de referencia (RefFinder).

Método	Orden				
	1	2	3	4	5
Delta Ct	TOP2B	CNL3	<i>β-actina</i>	RFLPO	PPIA
BestKeeper	<i>β-actina</i>	TOP2B	CNL3	PPIA	RFLPO
Normfinder	TOP2B	CNL3	<i>β actina</i>	RFLPO	PPIA
Genorm	TOP2B/CLN3		RFLPO	<i>β-actina</i>	PPIA
Recomendado¹	TOP2B	CNL3	<i>β actina</i>	RFLPO	PPIA

¹ Ordenados de acuerdo a la media geométrica de los valores de rango numérico de los cuatro métodos (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>)

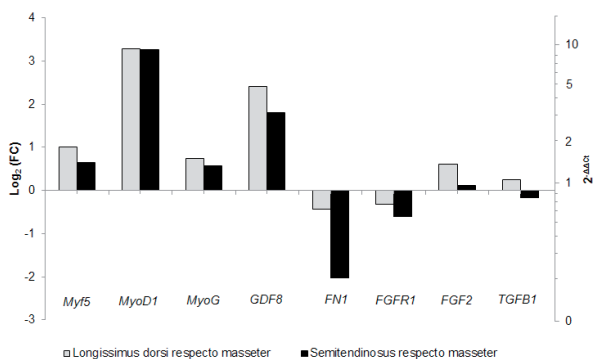


Figura 1. Expresión relativa (Log_2FC y $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) de los marcadores mio y fibrogénicos en pools de cDNA en muestras de tres músculos de terneros de raza Pirenaica.

MIO AND FIBROGENIC MARKERS RELATED TO THE DEVELOPMENT OF INTRAMUSCULAR FAT IN PIRENAICA BEEF

ABSTRACT: Fat, muscle, bone and connective tissue proceed from the same mesenchymal cells. A better knowledge of the relationship between myogenic and fibrogenic factors and intramuscular fat development could be of importance to improve quality of beef. RT-qPCR is an accurate technique to measure gene expression under different experimental conditions. Then, primers to analyze markers involved in myogenesis (*Myf5*, *MyoD1*, *MyoG*), fibrogenesis (*FN1*, *FGFR1*, *FGF2*, *TGFβ1*) and *myostatin* (*GDF8*) were selected. Pirenaica young bulls ($n=4$) were used to obtain mRNA from the muscles *Masseter*, *Longissimus dorsi* and *Semitendinosus*. Efficiencies and R^2 values were calculated, showing good adjustment. As the reliability of qPCR depends on normalization against stable reference genes, five genes were tested to find out the most suitable (*β-actin*, *CNL3*, *RFLPO*, *PPIA* and *TOP2B*). Based on the stability evaluation of the genes (RefFinder) *TOP2B* and *β-actin* were selected to be used as reference genes in this study. Finally, the preliminary results obtained with cDNA pools showed that *Masseter* presented lower expression of the myogenic markers and *GDF8* while it had higher expression for some fibrogenic factors (*FN1*). These results could be related with the differences in metabolism and fiber composition of the muscles studied.

Keywords: intramuscular fat, myogenesis, fibrogenesis, qPCR.

ANÁLISIS GENÓMICO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ISOFORMAS DE RNA MENSAJERO EN CERDOS CON PERFILES LIPÍDICOS DIVERGENTES

Cardoso, T.^{1,2}, Quintanilla, R.³, Amills, M.¹, Canela, O.³, González-Prendes, R.¹ y Cánovas, A.¹

¹Departament de Genètica Animal, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193. España.

²Fundación CAPES, Ministerio de Educación de Brasil, Brasilia - DF 70040-020, Brasil.

³Genética y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimon, Caldes de Montbui, 08140. España.

INTRODUCCIÓN

El metabolismo lipídico muscular porcino está influenciado por una multitud de factores genéticos y ambientales (Rosenvold et al., 2003). Una de las aproximaciones para comprender la fisiología genómica de dicho carácter consiste en comparar los patrones de expresión de individuos con perfiles divergentes para fenotipos de engrasamiento (Cánovas et al., 2010a; Puig-Oliveras et al., 2014). Sin embargo, se ha analizado muy poco si la expresión diferencial afecta por igual a todos los transcritos, generados por procesamiento (*splicing*) alternativo, a partir de un RNAm, o bien únicamente afecta a una isoforma concreta del mismo. Esta cuestión es relevante puesto que en los genomas de mamíferos la gran mayoría de genes están sometidos a *splicing* alternativo, generando una amplia variedad de transcritos que pueden tener efectos funcionales diferentes (Witten et al., 2011). Los patrones de *splicing* pueden estar afectados por polimorfismos nucleotídicos (SNPs) exónicos localizados en secuencias potenciadoras (*enhancer*) del *splicing* o incluso en los mismos lugares consenso de *splicing*. El advenimiento de la tecnología de “RNA-Sequencing”, ha permitido cuantificar, por primera vez, la expresión diferencial de isoformas de RNAm a una escala genómica así como identificar las variaciones estructurales en el transcriptoma (Piskolet et al., 2013). Por otra parte, el análisis conjunto de datos genómicos estructurales y de expresión (genética/genómica) con las técnicas de modelización de sistemas complejos (biología de sistemas) ofrece la oportunidad de estudiar la regulación del transcriptoma muscular desde una perspectiva más completa y profunda. En este trabajo se ha analizado el transcriptoma del músculo *Gluteus medius* en dos grupos de cerdos con fenotipos lipídicos divergentes (ALTO y BAJO) mediante la tecnología de “RNA-Sequencing”. Nuestro objetivo principal consiste en identificar isoformas mRNA diferencialmente expresadas entre ambos grupos. Por otra parte, se pretende averiguar si hay polimorfismos genéticos que segreguen específicamente en los grupos ALTO y BAJO, y correlacionar dicha información con los patrones de *splicing*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras biológicas y Diseño Experimental: El material animal utilizado en el presente estudio procede de muestras del músculo *gluteus medius* (GM) de una población comercial Duroc de 350 individuos con alto contenido en grasa intramuscular (Gallardo et al., 2008). Se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA) para seleccionar los animales con perfiles lipídicos divergentes para una combinación de 13 caracteres relacionados con el depósito de grasa y los niveles de lípidos plasmáticos (Cánovas et al., 2010a). Finalmente, se han seleccionado 52 animales distribuidos en dos grupos ALTO (n=26) y BAJO (n=26) de acuerdo a su perfil lipídico.

RNA-Sequencing: Con la finalidad de medir la expresión génica con una elevada resolución y analizar la estructura de los transcritos, se ha secuenciado mediante la tecnología *RNA-Sequencing*, el transcriptoma de 52 músculos GM con la plataforma HiSeq2000 (Illumina, Inc.). Las lecturas han sido mapeadas de acuerdo al genoma de referencia porcino (versión 78; ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-78/genbank/sus_scrofa/) utilizando el software CLC Bio Genomics (Qiagen).

Variación estructural: Los datos de expresión se han normalizado calculando RPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas) para cada gen y se han transformado para seguir una distribución normal. La expresión diferencial de los transcritos y la selección de los genes que presentan más de una isoforma *splicing*, se ha realizado mediante el análisis empírico “*digital gene expression* (DGE)” descrito por Robinson y Smyth (2008). La expresión de cada una de las variantes de *splicing* alternativo ha sido

normalizada mediante el cálculo del número de lecturas. La detección de SNPs se ha llevado a cabo de acuerdo a un modelo estadístico que permite discriminar errores de secuenciación de variantes que segregan a baja frecuencia. La identificación y filtrado de SNPs artefactuales se ha realizado aplicando los parámetros descritos en Cánovas et al. (2010b).

Análisis de vías metabólicas: Se ha integrado la información estructural y funcional derivada de los datos genómicos con el fin de identificar los genes que actúan como reguladores del depósito de la grasa en el músculo porcino. Para identificar las rutas metabólicas más representadas en la lista de genes con variantes de *splicing* diferencialmente expresadas en los grupos ALTO y BAJO, se ha utilizado el software IPA (Qiagen).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la tecnología de *RNA-Sequencing* se ha obtenido un total de 70 millones de lecturas *paired-end*, de las cuales el 80% ha mapeado en el genoma de referencia porcino. Se ha identificado 2.937 genes diferencialmente expresados (DE) entre los animales con ALTO y BAJO nivel de engrasamiento ($p < 0,05$). En un segundo análisis más estricto, $p < 0,01$ y Fold-change (FC) $> 1,5$, se ha identificado 96 genes DE. El análisis de rutas metabólicas ha evidenciado que los genes DE entre los grupos ALTO y BAJO están involucrados en la ruta de la glucólisis y gluconeogénesis, señalización mediante el factor de transcripción PPAR, fosforilación oxidativa y biosíntesis de ácidos grasos.

En el estudio de la variación estructural del transcriptoma del músculo porcino, se ha identificado 181 isoformas generadas por *splicing* (correspondientes a 141 genes) diferencialmente expresadas en los grupos ALTO y BAJO ($p < 0,05$). Aplicando criterios más estrictos ($p < 0,01$ y $FC > 1,5$), se ha detectado 30 isoformas (correspondientes a 28 genes) con expresión diferencial. La Tabla 1 muestra algunas de las variantes *splicing* con una expresión diferencial más significativa. Un total de 21 isoformas mRNA ha presentado una expresión aumentada en el grupo ALTO (p.e. *ITGA5*, *HP*, *SCD*, *TIMP1*), mientras que 9 han observado una menor expresión (p.e. *UBD*, *RXRG*, *IGJ*, *SPINK4*). Por ejemplo, el gen *UBD*, relacionado con la diabetes, codifica dos isoformas mRNA de 1.281 pb y 534 pb, de las cuales sólo la isoforma de 1.281 pb presenta expresión diferencial. De modo similar, el gen *SCD*, que tiene un papel clave en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, codifica 4 isoformas distintas (5.585 pb, 1.791 pb, 742 pb y 690 pb), presentando una expresión diferencial restringida a la isoforma de 5.585 pb. En definitiva, nuestros resultados indican que una fracción importante de la expresión diferencial entre grupos afecta, de manera selectiva, a ciertas isoformas mRNA. El conocimiento funcional de estas variantes *splicing* permitiría comprender como la variación estructural de los transcritos generada por procesamiento alternativo del RNAm afecta al metabolismo lipídico porcino y a la calidad de la carne.

Tabla 1. Isoformas mRNA diferencialmente expresadas en cerdos con fenotipos divergentes para caracteres relacionados con el metabolismo lipídico.

Gen	SSC	Transcrito (pb)	Expresión	P-Value	RPKM ALTO	RPKM BAJO
HP	6	1.340	x 4,02	0,00001	0,79	3,19
IGJ	8	1.327	x -6,83	0,00120	42,35	6,20
IL4R	3	1.579	x 1,84	0,00066	4,27	7,87
IL4R	3	2.574	x 1,90	0,00479	2,63	4,93
LITAF	3	2.190	x 1,92	0,00010	2,56	3,24
RXRG	4	544	x -1,68	0,00041	5,46	3,24
SCD	14	5.585	x 1,96	0,00324	7,53	14,77
UBD	1	1281	x -1,70	0,0010	2,37	4,05

*RPKM: Lecturas por kilobase de transcripción por millón de lecturas mapeadas

Por otra parte, se ha observado la existencia de polimorfismos nucleotídicos (SNPs) del transcriptoma que segregan de forma específica en los grupos ALTO o BAJO. Más concretamente, se ha identificado 2.955 (16,8% no-sinónimos) y 1.467 (12% no-sinónimos)

SNP específicos de los grupos ALTO y BAJO, respectivamente. Algunos de estos SNPs están localizados en loci relevantes desde un punto de vista metabólico p.e. ciertos SNPs situados en los genes *DHRS7C* (deshidrogenasa/reductasa expresada en cardiomiocitos), *MYO18B* (regulador de genes específicos del músculo) e *IRS1* (receptor 1 de la insulina), segregan únicamente en los cerdos del grupo ALTO. Por otra parte, SNPs localizados en los genes *PYGM* (una de las enzimas que participan en la glucógenesis muscular), *CPE* (carboxipeptidasa) y *PARVB* (organización del citoesqueleto), segregan únicamente en los animales pertenecientes al grupo BAJO. Es posible que una fracción de los SNPs específicos de grupo explique parte de las diferencias fenotípicas que existen entre cerdos con perfiles lipídicos divergentes.

Asimismo, en algunos casos se ha identificado genes que presentan expresión diferencial a nivel de variantes *splicing* y que también poseen SNPs que segregan específicamente en los grupos ALTO o BAJO. Por ejemplo, la isoforma de 814 pb del gen *CFL1* (Cofilin 1), el cual afecta a la proporción de ácidos grasos poli-insaturados n-6/n-3 en vacuno (Sevane et al., 2014), está sobre-expresada en los cerdos del grupo ALTO. Por otra parte, el gen *CFL1* posee un SNP no-sinónimo en la posición g.5578687(T>A), que segrega específicamente en el grupo ALTO. Resultaría de gran interés determinar si existe algún vínculo funcional entre la expresión diferencial de isoformas mRNA y la segregación grupo-específica de SNPs que pudieran afectar al mecanismo de *splicing*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Cánovas et al., 2010a. BMC Genomics. 11:372. • Cánovas et al., 2010b. Mamm. Genome, 21:592-598. • Gallardo et al., 2008. Physiol. Genomics. 35,3:199-209. • Piskol et al., 2013. Am. J. Hum. Genet. 3,93:641-51. • Puig-Oliveras et al., 2014. PloS One. 9: e99720. • Robinson & Smyth. 2008. Biostatistics. 2:321-32. • Rosenvold & Andersen. 2003. Meat Sci. 64:219–237. • Sevane et al., 2014. J. Anim. Sci. & Biotech. 5:20. • Witten & Ule. 2011. Trends Genet. 27:89-97

Agradecimientos: Financiado por el proyecto AGL2010-22208-C02-01. A. Cánovas disputa de un contrato financiado por el programa Juan de la Cierva (JCI-2011-10804). Los autores agradecen la colaboración de Selección Batallé y del personal de IRTA-Monells en la obtención del material animal y los datos fenotípicos.

A GENOME-WIDE ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED MESSENGER RNA ISOFORMS IN PIGS WITH DIVERGENT LIPID PROFILES

ABSTRACT: We have used *RNA-Sequencing* to examine the structural variation of the *gluteus medius* (GM) muscle transcriptome of commercial Duroc pigs with divergent phenotypes (HIGH and LOW) for 13 fatness traits. The whole transcriptome of 52 GM samples from HIGH (n=26) and LOW (n=26) pigs was sequenced with a HiSeq2000 platform. In this way, 30 splice variants were differentially expressed between pigs with divergent fatness traits ($p < 0.01$ and Fold-change > 1.5). Pathway analysis evidenced that most of differentially expressed genes belong to the glycolysis and gluconeogenesis, oxidative phosphorylation, insulin signaling and fatty acid biosynthesis metabolic routes. We can conclude that in many instances differential expression targets specific mRNA isoforms rather than the global set of transcripts produced by a given gene. Besides, several SNP variants segregated specifically in either the HIGH (2,995 SNPs) or LOW (1,467 SNPs) fatness profiles. Among them, 479 (16.8% of HIGH group-specific SNPs) and 177 (12.0% of LOW group-specific SNPs) were associated with amino acid changes. It would be interesting to correlate SNP frequencies and isoform differential expression data to identify polymorphisms with effects on the mechanism of splicing.

Keywords: *RNA-Sequencing*, Alternative *splicing*, SNPs, Intramuscular fat.

ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE EN DOS RAZAS OVINAS.

Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B. y Arranz, J.J.

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. E-mail del autor responsable asuav@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de leche de oveja es de unos 10 millones de toneladas anuales siendo la cuarta en importancia. España se sitúa como el séptimo productor mundial de leche de oveja (FAOSTAT, 2012), siendo la comunidad de Castilla y León la que genera un 70% de esta producción láctea (352.501.000 litros en 2011) (MAGRAMA, 2015). En general, la leche de oveja es procesada para la elaboración de productos lácteos, principalmente queso. Desde este punto de vista, el porcentaje de sólidos totales en leche o extracto quesero (grasa y proteína) adquiere una importancia relevante. La síntesis de lípidos en leche tiene especial interés debido a su influencia en el procesado y en las propiedades organolépticas que confieren al queso. Por ello, el conocimiento de los genes que desempeñan un papel relevante en la síntesis de grasa de la leche y de las variaciones en cuantitativas y cualitativas de los mismos a lo largo de la lactación en el ganado ovino, presentan un especial interés en la mejora de la producción lechera de dicha especie. Recientemente, las técnicas de secuenciación masiva paralela de RNA (RNA-seq) nos han permitido comparar los niveles de expresión génica entre distintos grupos de individuos y tejidos (Mortazavi et al., 2008; Wang et al., 2009). Para este estudio se han obtenido datos de RNA-seq de 8 animales pertenecientes a dos razas ovinas lecheras, Assaf y Churra, de las cuales se han tomado muestras de leche a lo largo de la lactación, en concreto los días 10, 50, 120 y 150 después del parto. Estas razas difieren en el porcentaje total de grasa en leche, un 6,65 % en Assaf y un 7,01 % en Churra (MAGRAMA, 2015). El metabolismo lipídico en la glándula mamaria puede subdividirse en: (i) captación de ácidos grasos del torrente circulatorio, (ii) síntesis *de novo* y desaturación de ácidos grasos y (iii) esterificación y secreción de la grasa mamaria. El número de genes que intervienen en estos procesos es elevado y sus interacciones complejas, para este trabajo inicial hemos analizado el perfil de expresión de 7 genes (*VLDLR*, *LPL*, *ACACA*, *FASN*, *SCD1*, *BTN1A1* y *XDH*) con influencia (Bionaz y Loor, 2008) en cada uno de los distintos procesos del metabolismo lipídico de la glándula mamaria a lo largo de la lactación en dos razas ovinas (Churra y Assaf).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado muestras procedentes de 8 ovejas libres de mamitis y sometidas a la misma dieta, 4 ovejas de raza Assaf y 4 ovejas de raza Churra. De cada animal se recogieron 50 ml de leche los días 10, 50, 120 y 150 de lactación. Las muestras fueron recogidas una hora después del ordeño de las 8 de la mañana, coincidiendo con el punto de máxima concentración de células somáticas en leche, según lo expuesto por Gonzalo et al. (1994). El RNA se extrajo a partir de 50 ml de leche siguiendo el protocolo descrito por Wickramasinghe et al. (2012), con ciertas modificaciones. La integridad del RNA (valor RIN) se analizó utilizando el *Bioanalyzer Agilent 2100* (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Los valores de RIN de las muestras de RNA oscilaron entre 7 y 9. Las genotecas de RNA de extremos pareados (*paired-end libraries*) con fragmentos de 300 pb se crearon con el kit *True-Seq RNA-Seq simple preparation v2* (Illumina, San Diego, CA, USA). Los fragmentos fueron secuenciados en el CNAG en un secuenciador *Illumina Hi-Seq 2000*, generando lecturas *paired-end* de 75 pb.

El control de calidad de los datos brutos de secuenciación se realizó utilizando el programa *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas fueron mapeadas contra el genoma ovino. (OAR v.3.1) utilizando el programa *STAR_2.3.0e* (Dobin et al., 2013). El paquete bioinformático *Cufflinks* (Trapnell et al., 2010) se utilizó para ensamblar las lecturas mapeadas y crear un archivo de anotación de referencia. La cuantificación del número bruto de lecturas por gen se llevó a cabo utilizando el programa *SigCufflinks* (<http://www.siggenae.org>).

El paquete de R *DESeq2* (Love et al., 2014), fue utilizado en el análisis de expresión diferencial. Nuestro experimento, está compuesto por 2 razas de animales (Churra y Assaf) y cuatro días diferentes de muestreo para cada grupo (Día 10, Día 50, Día 120 y Día 150).

Para el análisis de la expresión diferencial se utilizó el siguiente modelo: $Y = raza + día + (raza \times día) + error$. Una vez realizado el análisis con la función DESeq, se extrajeron los recuentos normalizados para los genes de interés con la función *plotCounts*. Para cada grupo de réplicas biológicas, se calculó la media, desviación estándar y error estándar para cada uno de los genes analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nivel de expresión de los genes analizados es muy variable a lo largo de los diferentes momentos de la lactación. Ninguno de los genes seleccionados muestra diferencias significativas al comparar las distintas razas o los distintos puntos de lactación. Cuando nos fijamos en el perfil transcripcional de los genes analizados (Figura 1), podemos ver que, en general, la expresión en la raza Churra es ligeramente superior que en Assaf. Aunque cabe resaltar que la variabilidad entre los animales de raza Churra es también superior que entre las réplicas biológicas de la raza Assaf. La lipoprotein-lipasa (*LPL*) y el receptor de lipoproteína de muy baja densidad (*VLDLR*) están implicados en la captación de los ácidos grasos por la glándula mamaria. El *LPL* se expresa más que el *VLDLR* e incrementa su expresión a lo largo de la lactación. El gen *ACACA*, *FASN* y *SCD1* están relacionados con la síntesis *de novo* y la desaturación de ácidos grasos. Al igual que ocurre en el ganado bovino (Wickramasinghe et al., 2012), el gen *ACACA* tiene una expresión muy baja en relación con el gen *FASN*, sin embargo, ambos tienen un perfil de expresión paralelo. La expresión del *SCD1* aumenta progresivamente a lo largo de la lactación. La butirofilina (*BTN1A1*) y la Xantina deshidrogenasa (*XDH*) son proteínas implicadas en la formación del glóbulo graso (Bionaz y Loor, 2008). En el caso del ganado bovino la expresión de estos genes es muy elevada al inicio de la lactación y luego decrece (Wickramasinghe et al., 2012). En la oveja, en el caso de la *BTN1A1* se produce un incremento progresivo a lo largo de la lactación, la *XDH* se mantiene más o menos constante incrementándose ligeramente al final.

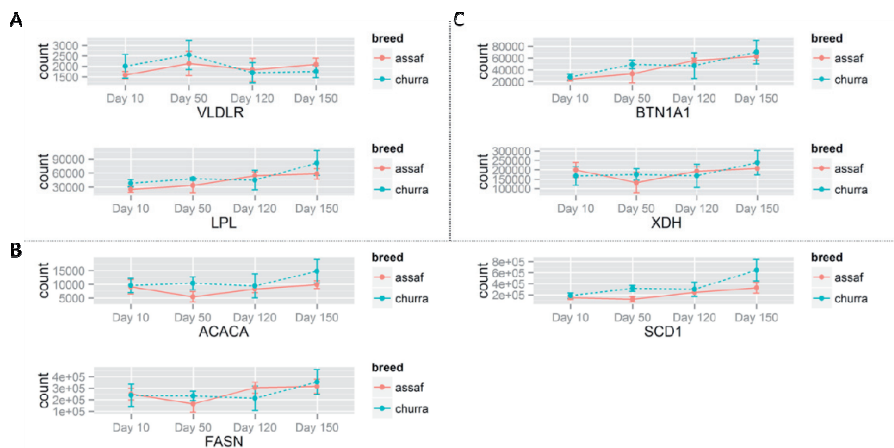


Figura 1. Perfiles de expresión de los genes implicados en el metabolismo lipídico de la glándula mamaria durante la lactación.

En general, la mayoría de los genes analizados incrementan su expresión a lo largo de la lactación, al contrario de lo descrito en el ganado bovino en la que la mayoría de los genes muestran su mayor expresión al inicio de la misma (Wickramasinghe et al., 2012). Como se puede observar en la figura 2, los tres genes con mayor expresión son *FASN*, *SCD1* y *XDH*. *FASN*, que codifica para la ácido graso sintasa, está implicado en la producción de ácidos grasos *de novo* y es el gen más expresado al comienzo de la lactación en las dos razas. La esteroil-CoA desaturasa 1 (*SCD1*), es la principal encima implicada en la biosíntesis de ácidos grasos mono-insaturados en rumiantes (Ntambi y Miyazaki, 2004). El *SCD1*, es el gen más expresado al final de la lactación en ambas razas, siendo también el gen más expresado en Churra los días 50 y 120 de lactación. En la glándula mamaria de rumiantes,

este gen se encarga de la producción de cerca del 80% de la forma más común de ácido linoleico conjugado (CLA, isómero cis-9, trans-11, C18:2) (Corl et al., 2001). Está demostrado que el consumo de ácidos linoleicos conjugados es beneficioso para la salud humana por sus propiedades anti-carcinogénicas, anti-lipogénicas e inmunomoduladoras (Pariza et al., 1999). La elevada expresión de la estearoil-CoA desaturasa en la glándula mamaria de las ovejas de raza Churra podría estar relacionada con una mayor concentración de CLA y, por lo tanto, con una leche potencialmente más saludable.

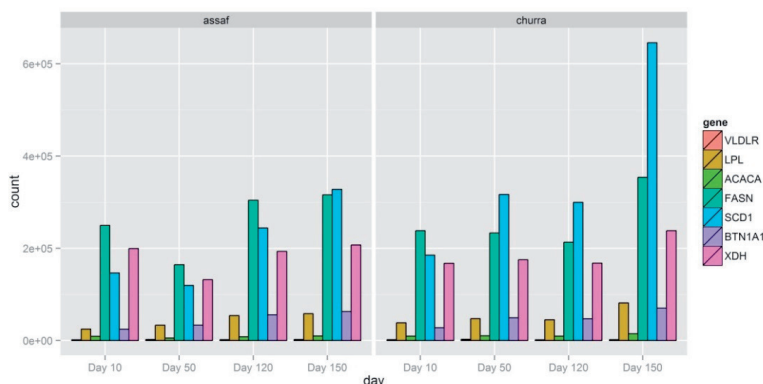


Figura 2. Recuentos normalizados de los genes implicados en el metabolismo lipídico de la glándula mamaria durante la lactación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bionaz, M. & Loor J.J., 2008. BMC Genomics. 9:366-2164-9-366.
- Corl, B.A. et al., 2001. J Nutr Biochem. 12(11):622-630.
- Dobin, A. et al., 2013. Bioinformatics. 29(1):15-21.
- Gonzalo, C. et al., 1994. J Dairy Sci. 77(7):1856-1859.
- Love, M.I. et al., 2014. Genome Biol. 15(12):550.
- Mortazavi, A. et al., 2008. Nat. Methods. 5(7):621-628.
- Ntambi, J.M. & Miyazaki, M., 2004. Prog. Lipid. Res. 43(2):91-104.
- Pariza, M.W. et al., 1999. Toxicol. Sci. 52(2 Suppl):107-110.
- Trapnell, C. et al., 2010. Nat. Biotechnol. 28(5):511-515.
- Wang, Z. et al., 2009. Nat. Rev. Genet. 10(1):57-63.
- Wickramasinghe, S. et al., 2012. BMC Genomics. 13:45-2164-13-45.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2012-34437 del Ministerio de Economía y Competitividad. B. Gutierrez-Gil es investigadora contratada a través del programa “Ramón y Cajal” del Ministerio de Economía y Competitividad.

STUDY OF THE TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF GENES REALTED TO THE MAMMARY GLAND FAT METABOLISM IN TWO OVINE BREEDS.

ABSTRACT: Sheep milk ranks the fourth position in terms of global milk production from different species. Most of the world's sheep milk is processed into dairy products, mostly cheese. Milk lipid synthesis as well as fatty acid esterification and milk fat secretion have a special interest due to their influence in manufacturing and organoleptic properties in dairy products. In this study we performed a RNA-seq analysis in two different dairy sheep breeds in order to evaluate the transcriptional profile of some genes implicated in the mammary gland fat metabolism along lactation. The selected genes are: *LPL* and *VLDL*, implicated in the fatty acid uptake from blood; *ACACA*, *FASN* and *SCD*, implicated in de novo synthesis and fatty acid desaturation; *BTN1A1* and *XDN* implicated in lipid droplet formation. None of the genes evaluated is significantly differentially expressed between the two breeds nor along lactation, but we can see changes in the expression profile. Mostly all of the genes analyzed increased their expression along lactation. *SCD1*, *ACACA* y *XDH* were the most abundant key genes measured, appearing to be key genes in milk fat metabolism.

Keywords: sheep, RNAseq, milk, fat metabolism.

IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA LA REGULACIÓN DE CRECIMIENTO Y ENGRASAMIENTO MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE HIPOTALAMO E HIGADO PORCINOS

Martínez-Montes, A.M.¹, Pérez-Montarelo, D., Rodríguez, M.C.¹, Barragán, C.¹, Núñez, Y.¹, Benitez, R.M.¹, Ibañez, N.², Folch, J.M.³, Silió, L.¹, Alves, E. y Fernández A.I.¹

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

La aplicación de técnicas de análisis masivo del genoma combinadas con técnicas de análisis más específicos, permite no sólo obtener datos “*omicos*” globales, sino también poder enfocar el análisis de genes concretos. Los resultados obtenidos con la técnica de RNA-Seq nos permiten no solo analizar diferencias de expresión, sino a su vez la identificación de variantes génicas (SNVs) presentes en genes candidato diferencialmente expresados (Salem et al., 2012; Cánovas et al., 2010). Mediante un correcto diseño experimental se puede utilizar esta técnica para identificar polimorfismos asociados con caracteres productivos de interés. Análisis realizados sobre un cruce experimental Ibérico x Landrace (IBMAP) han permitido analizar de forma precisa caracteres productivos, identificando varios regiones QTLs con efecto sobre crecimiento, deposición grasa y caracteres de calidad de la carne y grasa (Óvilo et al., 2002; Estellé et al., 2005; Fernández et al. 2012; Muñoz et al., 2013; Pena et al., 2013; Ramayo-Caldas et al., 2014).

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de genes candidatos que regulen procesos de desarrollo relacionados con caracteres productivos de interés. Para ello se han identificado polimorfismos candidatos a partir de datos de RNA-Seq en hígado e hipotálamo en individuos extremos para crecimiento y deposición grasa de un retrocruce del citado material experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y datos fenotípicos. 144 individuos procedentes de un retrocruce Ibérico x Landrace (F1 x Landrace) fueron utilizados para seleccionar dos grupos de individuos con fenotipos divergentes para crecimiento y deposición grasa (A y B). Para ello se llevó a cabo un análisis de componentes principales utilizando cuatro caracteres diferentes, cuyos valores medios fueron; ganancia media diaria 0,78 - 0,92 kg/d, espesor de tocino dorsal 11,6 - 16,2 mm y porcentajes de ácido linoleico (C18:2) en grasa dorsal 16,7 - 12,6 % e intramuscular 11,9 - 8,1 %.

Obtención de ARN, secuenciación. El kit *Ribopure™ of High Quality of Total RNA (Ambion)* fue utilizado para aislar el ARN de los individuos seleccionados. El proceso de secuenciación fue llevado a cabo mediante el servicio de secuenciación del CNAG (Barcelona) usando el equipo *Hi-Seq 2000 (Illumina)*, preparando pools de 3 muestras, con lecturas de 2x75 pb.

Mapeo y detección de SNVs. El software *CLC Genomics Workbench* fue utilizado para mapear las lecturas frente al genoma de referencia *Sscrofa10.2*, usando los parámetros por defecto. Una vez realizada la búsqueda de SNVs con una profundidad de lectura de 10x, se llevó a cabo una segunda búsqueda de SNPs con una cobertura de 3x para determinar el potencial genotipo de cada uno de los individuos.

Identificación de SNPs y genes candidatos. Una vez identificados potenciales SNPs, fueron filtrados en función de su relevancia y por la presencia de alelos alternativos en los individuos de los grupos A y B. La anotación funcional de los genes en los que se localizaban los SNPs se realizó utilizando la herramienta *FatiGO* de *Babelomics* que permitió seleccionar un panel de SNPs localizados en genes de interés. Una vez seleccionados los SNPs/genes candidatos fueron validados mediante secuenciación de Sanger.

Genotipado y asociación de genes candidatos. Tras la selección de los genes candidatos por función e interés biológico, se llevó a cabo el proceso de genotipado en 124 individuos del retrocruce mediante técnica de Sanger. El análisis de asociación se realizó tanto a nivel

de SNPs como de haplotipos, con los datos fenotípicos de interés; Peso de los 150 días (P150D), Grasa intramuscular (GRIM), Peso de Paletas, Jamones y Chuleteros (PAL, JAM, CHU). La identificación de los haplotipos se realizó utilizando el software PHASE. Para el análisis de asociación se utilizó el software Qxpack 5.0 (Pérez-Enciso y Misztal, 2011) usando el siguiente modelo:

$$Y = \mu + G + S + L + PC/ES + u + e$$

Donde Sexo y Lote (S y L) son los efectos fijos, Peso Canal y Edad de Sacrificio como covariables en función del carácter a analizar, G corresponde al genotipo del SNP, u es el efecto poligénico aleatorio del animal y e el residuo.

RESULTADOS

En el proceso de secuenciación se obtuvieron 839M y 877M de lecturas pareadas de 75 pb para hipotálamo e hígado. De un total 125k SNVs identificados en cada tejido aproximadamente 4.300 y 1.900 fueron seleccionados como altamente informativos en hipotálamo e hígado, de los cuales un 50% se encontraban localizados en genes anotados. En el análisis de anotación funcional se pudo ver que había un enriquecimiento funcional en procesos de interés asociados con los caracteres de deposición grasa y crecimiento, tales como regulación del desarrollo o metabolismo lipídico. En el proceso de validación mediante secuenciación clásica no solo se observaron los SNPs previamente descritos, sino que se detectaron nuevos SNPs no identificados por la técnica del RNA-Seq. Una vez identificados los bloques de SNPs que estaban cosegregando, un subconjunto de 140 SNPs informativos fue seleccionado para posteriores análisis, a partir de los cuales se eligieron los más relevantes para llevar a cabo la validación por secuenciación de 32 SNPs, 8 de ellos falsos positivos, estimándose así una tasa de error de 0,25, debido a fallos de alineamiento. A partir de estos SNPs se seleccionaron en dos de los genes más importantes, *SERPINE1* y *RETSAT*, los SNPs ENSSSCP00000026436: p.Ile150Val y ENSSSCP00000008794: p.Lys173Thr. Estos dos genes están asociados con composición y calidad de la carne y grasa (Weisz *et al.*, 2012, Moise *et al.*, 2010). El genotipado de estos polimorfismos mediante secuenciación Sanger permitieron identificar dos nuevos SNPs en el gen *SERPINE1*, ambos cosegregando con el SNP previamente descrito con un MAF=0,13 y mostrando únicamente dos genotipos, información insuficiente para el análisis de la asociación entre dichos polimorfismos y los caracteres de interés. Para el gen *RETSAT* se identificaron cuatro nuevos SNPs así como una delección en el gen *RETSAT*, con unos valores MAF entre 0,15 y 0,44. Se pudo observar que los SNPs 1 y 4 así como el 2 y 3 estaban cosegregando, por lo que los posteriores análisis de asociación se realizaron únicamente con los SNP1 y SNP2. Se pudieron identificar cuatro haplotipos diferentes para estos SNPs, pero ninguno de éstos mostró niveles de asociación significativos. Los resultados del análisis de asociación para cada SNP mostraron un efecto de 0,205 ($\pm 0,09$) del bloque compuesto por los SNPs uno y cuatro sobre el peso de los jamones, mostrando efecto contrario frente a la delección, -0,272 ($\pm 0,13$). Estos resultados, por su carácter preliminar, deben ser confirmados en una muestra más amplia de individuos del material IBMAP.

En este estudio se ha mostrado un ejemplo de la combinación del uso de una técnica de análisis masivo (RNA-Seq) junto con el estudio específico con técnicas más convencionales de genes y polimorfismos potencialmente relacionados con caracteres productivos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Óvilo, C., Clop, A., Noguera, J.L. et al. 2002. J. Anim. Sci. 80,2801-2808.
- Estellé, J., Mercadé, A., Noguera J.L., et al. 2005. J. Anim. Sci. 83(12):2723-8.
- Fernández, A.I., Pérez-Montarelo, D., Barragán, C. et al. 2012. BMC Genetics 13, 41.
- Muñoz, M., Rodríguez, M.C., Alves, E. 2013. BMC Genomics 14:845.
- Pena, R.N., Noguera J.L., Casellas, J., et al. 2013. Anim. Genet. 44(6):648-80.
- Ramayo-Caldas, Y., Ballester, M., Fortes, M.R.S., et al. 2014. BMC Genomics 15:232.
- Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2011. Bioinformatics 12:202.
- Moise,

A.R., Lobo, G.P., Erokwu, B. *et al.* 2010. *FASEB J.* 24(4):1261-70. • Weisz, F., Bartenschlager, H., Knoll, A. *et al.* 2012. *Anim. Genet.* 43(5):614-9

Agradecimientos: Este estudio se ha realizado bajo el marco del proyecto AGL2011-29821-C02. Martínez A.M. disfruta de beca FPI (BES-2012-056563).

Tabla 1. Resultados del análisis de asociación para cada uno de los cuatro bloques de SNPs (*RETSAT1*, *RETSAT2*, *RETSAT_DEL* y *RETSAT5*), mostrando el p-val, el efecto de la asociación y el error estimado.

	RETSAT1			RETSAT2			RETSAT_DEL			RETSAT5		
	P-Val	Efecto	Error	P-Val	Efecto	Error	P-Val	Efecto	Error	P-Val	Efecto	Error
W150D	0,092	1,112	1,239	0,527	-1,139	1,874	0,548	-1,230	1,929	0,217	-1,951	1,571
GRIM	0,968	0,001	0,097	0,205	0,174	0,140	0,193	-0,191	0,143	0,662	0,045	0,126
JAM	0,019	0,205	0,087	0,383	0,115	0,138	0,042	-0,272	0,132	0,180	-0,164	0,120
PAL	0,539	0,030	0,049	1,000	0,000	0,075	0,896	-0,012	0,073	1,000	0,000	0,066
CHU	0,103	0,135	0,082	0,695	-0,051	0,127	0,076	-0,220	0,123	0,220	-0,137	0,111

IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR THE REGULATION OF GROWTH AND FATNESS IN PORCINE MUSCLE BY TRANSCRIPTOME ANALYSIS

Using RNA-Seq as a sequencing technique, not only with the purpose of differential expression analyses, but for extracting genotypic information from the obtained data. In our study we were able to identify SNPs from a RNA-Seq assay from hypothalamus and liver tissues that shown different genotypes between animals with divergent phenotypes for growth and fatness. A total of 125k of SNPs were identified in both tissues analyzed, being 6k SNPs qualified as highly informative SNPs. We focused the analysis on more specific data, using different filters to identify two relevant genes, *SERPINE1* and *RETSAT*, that contain polymorphisms associated with important production traits.

Keywords: RNA-Seq, SNP-Identification, *SERPINE1*, *RETSAT*.

COMPARACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA MUSCULAR DE CERDOS IBÉRICOS PUROS Y CRUZADOS CON DUROC AL NACIMIENTO.

Ayuso¹, M., Fernández, A., González-Bulnes, A., Isabel, B., Fernández, A.I., Rey, A.I., Nuñez, Y., Benítez, R., Medrano, J.F., Cánovas, A., López-Bote, C.J. y Óvilo, C.

¹ Dpto. Producción Animal, UCM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid
mayher@live.com

INTRODUCCIÓN

El cerdo Ibérico es una raza autóctona destinada fundamentalmente a la obtención de productos cárnicos de alta calidad. Los rendimientos reproductivos y productivos son bajos; por ello, es habitual el uso de la raza Duroc como línea paterna terminal. Actualmente, la legislación española contempla el uso de esta raza y establece la denominación "Ibérico" para productos obtenidos de cruces de Ibérico x Duroc (IB x DU) al 50% (Real Decreto 4/2014). Sin embargo, animales ibéricos puros y cruzados presentan diferencias importantes en el crecimiento muscular y adipogénesis desde estadios muy tempranos del desarrollo, por lo que en cerdos cruzados, se observa un aumento del rendimiento pero un descenso en la calidad de la carne respecto a cerdos Ibéricos puros (Ventanas et al., 2006). Recientemente, se ha realizado un estudio comparativo del transcriptoma de músculo *longissimus dorsi* de lechones Ibéricos puros e IB x DU al destete mediante la técnica de *microarrays* (Óvilo et al., 2014); los resultados muestran que diversos genes y rutas metabólicas involucradas en el desarrollo muscular y el metabolismo lipídico se encontraban diferencialmente expresados entre ambos grupos.

El objetivo del presente trabajo es profundizar en el estudio del transcriptoma muscular de cerdos Ibéricos puros e IB x DU mediante la tecnología de RNA-Seq. Esta técnica permite medir la expresión génica de manera más precisa y exhaustiva que los *microarrays* (Marioni et al., 2008) con el fin de identificar genes o rutas metabólicas que puedan estar implicados en las diferencias de calidad observadas entre ambos genotipos. El estudio del transcriptoma se realizó en músculo del jamón (*Biceps femoris*), por su relevancia desde el punto de vista productivo, y en animales al nacimiento donde los procesos de mio y adipogénesis son especialmente activos. Además se realizó una búsqueda de potenciales factores de transcripción reguladores para las diferencias de expresión observadas entre tipos genéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y toma de muestras: El estudio se realizó sobre un total de 19 machos recién nacidos, 9 Ibéricos (IB) puros y 10 Ibéricos cruzados al 50% con Duroc (CR). En ellos, se registró el peso y longitud de la canal y el peso del jamón y se obtuvieron muestras de músculo *Biceps femoris* para el análisis de contenido en grasa intramuscular (GIM) y ácidos grasos (AG) y para el estudio de expresión génica.

Estudio de expresión génica: Se extrajo ARN total con el sistema Ribopure (Ambion) de muestras de 12 animales (6 IB y 6 CR). Se generaron bibliotecas que fueron secuenciadas utilizando la plataforma HiSeq2000 (Illumina, Inc.) Se utilizó el software CLC Genomic workbench (Qiagen, Aarhus, Denmark) para llevar a cabo el control de calidad, ensamblaje con el genoma de referencia porcino (Sscrofa10.2), normalización en RPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas), según fue descrito por Mortazavi et al. (2008) y análisis estadístico para la identificación de genes diferencialmente expresados (DE). Sólo los genes con *fold-change* (FC) superior a 1,5, expresión superior a 0,5 RPKM en al menos uno de los dos grupos y $P < 0,01$ se consideraron DE.

Estudio de biología de sistemas: Se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO asociados a genes DE mediante la herramienta online de anotación funcional del Max Planck Institute y se utilizó el software Ingenuity Pathway (IPA, Qiagen, Silicon Valley, CA) para la identificación de rutas metabólicas, funciones enriquecidas, así como en la construcción de redes con los genes DE. Por último, con el fin de identificar genes reguladores que podrían estar influyendo en la expresión de los genes DE y, por lo tanto en el fenotipo, se llevaron a cabo dos aproximaciones. En primer lugar se utilizó el software IPA para detectar posibles reguladores expresados

en nuestros animales. Por otro lado, determinamos los factores de transcripción potencialmente implicados en las diferencias de expresión mediante el estudio de *regulatory impact factors* (RIF) siguiendo la metodología descrita por Reverter et al. (2010) a partir de genes expresados en nuestros animales y considerados factores de transcripción (FT) en la base de datos AnimalTFDB (www.bioguo.org/AnimalTFDB/).

Análisis composición de AG: La extracción se realizó mediante el procedimiento *one-step* descrito por Sukhija y Palmquist (1988) a partir de muestras liofilizadas y su posterior análisis en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP-6890 (Avondale, PA, USA). Se empleó un patrón interno (C15:0) para determinar la cantidad total de GIM. La influencia del tipo genético sobre la composición de AG se analizó mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tipo genético afectó a los caracteres fenotípicos estudiados en los animales sacrificados al nacimiento. Los cerdos IB mostraron un menor peso y longitud de la canal, así como menor peso del jamón ($P < 0,001$). Por el contrario, dichos animales tendieron a presentar mayor cantidad de GIM ($P = 0,0716$) y menor cantidad de AG saturados ($P = 0,0861$), en concordancia con los resultados observados previamente en animales adultos (Lopez-Bote, 1998)

El estudio funcional de genes DE identificados mediante secuenciación del ARNm permitió identificar los mecanismos genéticos involucrados en las diferencias fenotípicas. Un total de 150 genes se encontraron DE entre grupos; de ellos, 95 genes se encontraban sobreexpresados en IB, con FC entre 1.9 y 12, y 55 genes en CR, con FC entre 2 y 63.5. Se observó un enriquecimiento de términos GO estrechamente relacionados con el desarrollo del tejido muscular, como la adhesión celular y el desarrollo muscular, coincidiendo con los puntos críticos que se intentan mejorar con la incorporación de genética Duroc a los cerdos Ibéricos (Lopez-Bote, 1998). Además, los genes sobreexpresados en IB están positivamente relacionados con el metabolismo lipídico y la homeostasis energética y negativamente con el desarrollo de tejido muscular; todo ello es consistente con las diferencias fenotípicas antes mencionadas entre las dos razas.

En el estudio de rutas metabólicas, se observó que tanto genes sobreexpresados en IB como en CR intervienen en la ruta "*RXR/LXR activation pathway*", relacionada con la síntesis de colesterol y la lipogénesis. Por otro lado, se encontraron rutas que únicamente fueron asociadas a uno de los dos grupos; así, en el grupo de genes sobreexpresados en IB se identificaron rutas relacionadas con el balance energético ("*IGF-1 Signaling*", "*Fatty Acid α -oxidation*"), mientras que en CR, predominaron rutas relacionadas con el funcionamiento y estructura celular, muy importante en el caso de las células musculares, como "*nNOS Signaling in Skeletal Muscle Cells*" y "*Actin Cytoskeleton Signaling*". Esto sugiere una mayor eficiencia en el músculo del cerdo ibérico para la acumulación de reservas energéticas, probablemente relacionado con el denominado "fenotipo ahorrador" asociado a esta raza. Además, los genes sobreexpresados en cada grupo fueron utilizados para construir redes de genes conectados entre sí que se relacionaron con funciones metabólicas interesantes, como las ya mencionadas.

El software IPA detectó un total de 42 potenciales reguladores para las diferencias de expresión observadas. Por otro lado, mediante el estudio de RIFs, identificamos 48 FT, los cuales fueron analizados conjuntamente con los genes DE mediante el software IPA, observándose que estos FT intervienen de forma significativa en rutas metabólicas de interés (Tabla 1), entre ellas la de adipogénesis. Cuatro genes fueron identificados siguiendo ambas aproximaciones. Estos genes son *TP53*, *IRF1*, *EGR2* y *FOXO1*. Entre ellos, cabe destacar el gen *EGR2* ya que disminuye la diferenciación de adipocitos desde células madre mientras aumenta la diferenciación de células musculares lisas (Wang et al., 2013). *FOXO1* es un regulador muy interesante porque se le ha asociado con diversos procesos que podrían tener un efecto importante sobre las diferencias fenotípicas observadas entre las dos razas, como son el crecimiento y diferenciación de mioblastos (Hakuno et al., 2011) o la regulación de la expresión de genes adipogénicos, como *PPARG* (Gupta et al, 2009).

Los resultados de expresión génica obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto numerosos genes involucrados en rutas metabólicas e interconectados entre sí que son potentes candidatos a explicar las diferencias fenotípicas relacionadas con parámetros productivos de interés, como el crecimiento, el contenido en magro o la deposición grasa, encontradas entre los dos genotipos porcinos estudiados, Ibérico puro e Ibérico x Duroc. En especial, los genes *PVALB*, sobreexpresado en CR (24X) y relacionado con la distrofia muscular, *APOM* y *SLC2A4*, sobreexpresado en IB e involucrados en el control del metabolismo lipídico, así como los FT *EGR2* y *FOXO1* merecen una especial atención y un estudio en profundidad en este material genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gupta, D., et al. 2013. J. Biol. Chem. 288:25440-25449.
- Hakuno, F., et al. 2011. PloS one 6: e25655.
- Lopez-Bote, C.J. 2008. Meat Sci. 49: S17-S27.
- Marioni, J., et al. 2008. Genome Res. 18: 1509 - 1517.
- Mortazavi, A et al. 2008. Nat. methods 5: 621-628.
- Ovilo, C., et al. 2014. BMC Genomics 15:413.
- Reverter, A., et al. 2010. Bioinformatics 26: 896-904.
- Sukhija, P.S. & Palmquist, D.L. 1988. J. Agric. Food Chem. 36: 1202–1206.
- Ventanas S., et al. 2006. Meat Sci. 73:651-659.
- Wang, S. S., et al. 2013. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45: 1825-1832..

Agradecimientos: AGL2010-21991-C03-00, e I. Martín de la Torre.

Tabla 1. Rutas metabólicas observadas considerando los factores de transcripción y los genes diferencialmente expresados entre Ibéricos puros e Ibérico x Duroc.

Ruta metabólica	p-valor	Genes involucrados
Adipogenesis pathway	0,001	<i>SLC2A4,DLK1,ZNF423,SIN3A,EGR2,SAP30L,STAT5B TP53,FOXO1</i>
LXR/RXR Activation	0,021	<i>TF,CLU,CCL2,FDFT1,MSR1,APOM</i>
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	0,028	<i>FOS,IRF1,CLU,MAP3K8,APOM,ZNF668</i>
Atherosclerosis Signaling	0,056	<i>CLU,CCL2,MSR1,ALOX12B,APOM</i>
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	0,060	<i>MYH3,CCL19,CLDN7,CXCL13,CCL2,MYH10</i>
PI3K Signaling in B Lymphocytes	0,060	<i>FOS,PLCD1,NFATC1,FOXO3,ATF3</i>
IL-17A Signaling in Fibroblasts	0,060	<i>FOS,CCL2,IL17RC</i>
Glucocorticoid Receptor Signaling	0,061	<i>FOS,SMAD2,CCL2,SMARCA2,STAT5B,NFATC1,FOXO3</i>

MUSCLE TRANSCRIPTOME COMPARISON OF PURE AND DUROC-CROSSBREED IBERIAN PIGS AT BIRTH.

ABSTRACT: Phenotypic differences in productive traits and meat quality have been reported between pure and Duroc-crossbreed Iberian pigs. The muscle transcriptome (*Biceps femoris*) of nine purebred Iberian and ten Duroc x Iberian crossbred pigs slaughtered at birth was studied to better understand causal molecular mechanisms. Several differentially expressed genes were identified (i.e. *APOM* and *SLC2A4*) as well as pathways involved in lipid metabolism and muscular development, such as adipogenesis pathway. Also, important regulatory factors such as *EGR2* and *FOXO1* were differentially expressed between pure and Duroc-crossbreed pigs. These results contribute to the better understanding of mechanisms underlying productive and meat quality differences between purebred and crossbred Iberian pigs.

Keywords: Iberian pig, RNA-Seq, transcription factor, meat quality.

ANÁLISIS GWAS PARA RESISTENCIA A NEMATODOS GASTROINTESTINALES MEDIANTE LA IMPUTACIÓN DE GENOTIPOS DEL CHIP DE ALTA DENSIDAD EN EL GANADO OVINO

Chitneedi, P.K., Atlija, M., Arranz, J.J. y Gutiérrez-Gil, B.
Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. Email: pchi@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (GIN) constituyen un grave problema para las explotaciones ovinas basadas en sistemas extensivos o semi-extensivos, tanto a nivel sanitario y de bienestar animal como a nivel de salud pública (posible riesgo de zoonosis y de residuos de fármacos antiparasitarios). Existe, por tanto, la necesidad de identificar métodos alternativos eficaces frente al método clásico de control basado exclusivamente en el uso de fármacos antiparasitarios. A raíz de diversos estudios que pusieron de manifiesto el componente genético de parte de la variación observada en la resistencia de las ovejas a los parásitos internos (revisado por Raadsma et al., 1997), distintos autores han propuesto la selección genética, combinada con otros métodos, como una estrategia eficaz de control de los GIN. En este contexto, el objetivo de este estudio es la identificación de regiones genómicas asociadas a Resistencia a GIN en una población comercial de Ganado ovino de raza Churra mediante un barrido genómico de alta densidad basado en un protocolo de imputación de los genotipos del *Illumina Ovine HD BeadChip* (HD-chip) en una población inicialmente genotipada con el *Illumina Ovine SNP50 BeadChip* (50K-chip), en base a un subconjunto de animales genotipados con el HD-chip utilizados como referencia. Tras la evaluación de la fiabilidad del proceso de imputación, y en base a los genotipos imputados se ha realizado un estudio de asociación a nivel genómico (GWAS, *Genome-wide Association Study*) con un carácter relacionado con los niveles de infección por GIN, los niveles séricos de Inmunoglobulina A (IgA) frente a *Teladorsagia circumcincta* (L-IV).

MATERIAL Y MÉTODOS

La población objeto de estudio es una población comercial de ganado ovino lechero de raza Churra que presenta la estructura de una población de 16 familias de medio-hermanas, incluyendo los 16 machos cabeza de pedigrí y 1.670 hijas, todas ellas pertenecientes a rebaños del Núcleo de Selección de Anche (ANCHE). Esta población base ha sido previamente genotipada con el chip de 50K SNPs. Tras el control de calidad realizado según García-Gámez et al. (2012) quedaron disponibles para análisis un total de 43.613 SNPs localizados en los cromosomas autosómicos.

La población de referencia utilizada para la imputación incluyó 240 animales de la población base, con 16 machos y 14 hijas de cada uno, que fueron genotipados con el HD-chip. Inicialmente se obtuvieron genotipos para un total de 606.006 marcadores SNPs, que tras el control de calidad se redujeron a 492.767 SNPs autosómicos, entre los cuales se incluyen la mayoría de los marcadores del 50K-chip. El proceso de imputación de los genotipos del HD-chip ausentes en los animales de la población genotipada con el 50K-chip se realizó con el software *Beagle* 3.3.2 (Browning & Browning et al., 2008). Los genotipos resultantes fueron convertidos a formato *Plink* (Purcell et al., 2007) con el programa *fcGENE* (Roshyara, et al., 2014). La imputación realizada con *Beagle* se basa en información poblacional (desequilibrio de ligamiento y frecuencias alélicas), obviándose en este caso la información proporcionada por el pedigrí de la población. Es por ello que en algunos casos, se pueden estimar genotipos incorrectamente o no realizar la imputación. Por ello, se estimó la fiabilidad de la imputación en base a la comparación de los genotipos imputados en las hijas de la población de referencia con sus genotipos directamente obtenidos con el HD-chip (genotipos imputados vs genotipos genuinos). Con el fin de evitar sesgos en esta evaluación, se realizaron 14 iteraciones de imputación, enmascarando en cada una de ellas el genotipo de 16 hijas, una de cada familia analizada.

Para un subconjunto de 533 animales de esta población se obtuvieron muestras de sangre para la obtención de medidas fenotípicas de IgA en suero sanguíneo, siendo los genotipos de estos animales los que se utilizaron para el análisis de asociación realizado posteriormente. Tras la normalización de los valores de IgA mediante la transformación *box-cox*, se estimaron las *Yield Deviations* (datos brutos corregidos para el efecto “rebaño”). El

análisis GWAS se realizó con *ProbABLE* (Aulchenko et al., 2010), un software específicamente desarrollado para realizar análisis GWA a partir de genotipos imputados. Siguiendo el protocolo sugerido por los desarrolladores de este programa, se realizó un primer análisis en *GenABLE* (Aulchenko et al., 2007) con el fin de estimar la matriz de varianzas y covarianzas, lo que proporciona un test de asociación entre el fenotipo a estudiar y los marcadores genéticos en las muestras de individuos relacionados. El segundo paso del análisis de asociación se realizó con *ProbABLE*, utilizando como datos genotípicos para el análisis, los archivos de probabilidad de imputación correcta para el SNP obtenidos en el proceso de imputación de *Beagle*. Los umbrales de significación análisis GWA se determinaron aplicando la corrección de Bonferroni, considerando el número de marcadores analizados para cada cromosoma (umbral 5% *chromosome-wise*) y para todo el genoma (umbral 5% *genome-wise*). Para calcular el número de marcadores “independientes” en cada caso, teniendo en cuenta el desequilibrio de ligamiento existente, se utilizó el programa *SimpleM* (Gao et al., 2008), asumiendo un valor de 0,995 para el parámetro PCA. Todos los análisis, imputación y GWA, se realizaron en un potente servidor Intel (procesador de 2.50GHz, 8 cores y 16GB RAM) en el CPU del Centro de Supercomputación de Castilla y León.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La precisión de la imputación realizada por *Beagle* se estimó usando la opción de concordancia de *Plink* (merge-mode 7) en los individuos genotipados para el 50K-chip y el HD-chip. Debido al alto tiempo de computación exigido en el proceso de imputación, la estimación de la fiabilidad se realizó en base a los resultados obtenidos en seis cromosomas de distinta longitud (cromosomas 1, 4, 10, 16, 20, 26). La concordancia promedio estimada a partir de las 14 iteraciones de imputación realizadas fue 90,85%, siendo muy similar entre los seis cromosomas analizados (rango: 90-92 %, SD promedio: $\pm 1,55\%$). Ha de tenerse en cuenta que esta estimación está afectada por la reducción de la potencia en el proceso de imputación debido al enmascaramiento de los animales utilizados como referencia en cada iteración. Así, cuando el proceso se realizó sin eliminar ningún animal de la población de referencia, la precisión de la imputación fue del 94%. Por ello, podemos considerar que la fiabilidad real proporcionada por *Beagle* en la población de Churra considerada varía entre 91-94%, suficientemente alta como para utilizar los genotipos imputados para posteriores análisis de asociación con caracteres de interés productivo. La precisión estimada en este estudio está dentro del rango de precisión de otros estudios realizados en oveja (83-93%, según la raza) estimado por (Hayes et al., 2012) utilizando *Beagle*. En el ganado vacuno, por lo general, los niveles de precisión obtenidos con este programa es más alta. Hozé et al. (2013) estimaron una precisión del 99% tras los análisis realizados en 16 razas de ganado vacuno francés. En ganado vacuno Holstein Chino (Weng et al., 2013) las estimaciones variaron entre el 90-98%, dependiendo de la proporción de individuos de referencia eliminados en las iteraciones.

El análisis de asociación con el fenotipo IgA realizado con *ProbABLE* identificó un único SNP significativo al nivel 5% *chromosome-wise* localizado en el cromosoma 15 (p -value corregido = 5,63), mientras que no se detectó ninguna asociación significativa al nivel 5% *genome-wise*. El marcador que mostró evidencia de influir los niveles de IgA es el oar3_OAR15_24870525, y se encuentra localizado en la posición 24.870.525 pb del OAR15. El efecto de sustitución alélica estimado para este SNP fue de $0,297 \pm 0,063$ unidades de las YDs analizadas (0,382 desviaciones estándar del fenotipo). De acuerdo a la base de datos *Sheep QTLdb* (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/OA/index>), la posición de este QTL se encuentra dentro del intervalo de confianza estimado (18,3-30,5 Mb) para un QTL con influencia sobre Fecal egg count (FEC), el clásico carácter indicador de los niveles de infección por GINs en una población de retrocruzamiento Red Maasai x Dorper (Silva et al., 2012). La falta de resultados significativos se puede explicar por la escasa potencia del estudio debido al limitado número de animales analizados. Para explotar la información de la estructura de diseño hija de la población en estudio, de forma complementaria a este análisis tipo GWA, se realizarán futuros análisis basados en análisis de ligamiento (LA) y la combinación de desequilibrio de ligamiento con análisis de ligamiento (LDLA).

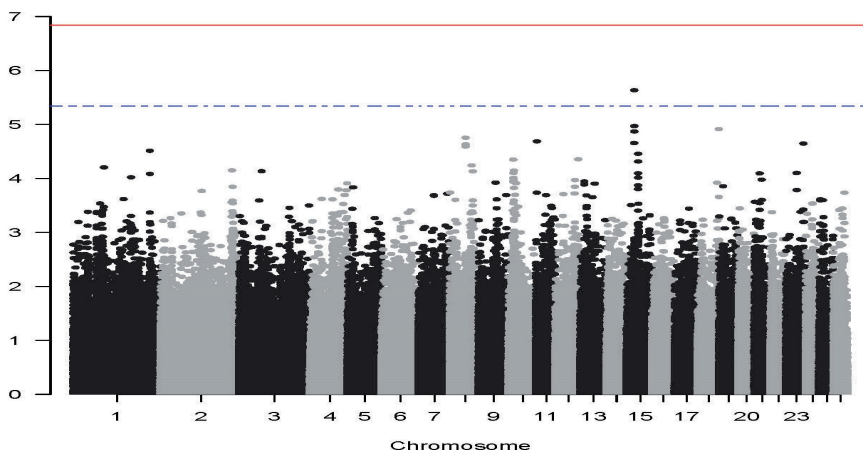


Figura 1. Resultado del análisis GWAS basado en los genotipos del HD-chip (700K) imputados con Beagle en la población comercial de ganado ovino analizada. Para el carácter analizado, IgA, se representan los valores $\log(1/P)$. Las líneas horizontales representan el umbral del 5% chromosome-wise promedio para los 26 autosomas (azul), y el umbral del 5% genome-wise (rojo); obtenidos tras la corrección de Bonferroni aplicada (Gao et al., 2011).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atlija et al. (2015). Anim. Genet. submitted
- Aulchenko et al. 2007. Bioinformatics 23, 1294-1296.
- Aulchenko et al. 2010. Bioinformatics 11,134.
- Gao et al., 2011. Genet. Epidemiol. 35, 154-158.
- Hayes et al. 2012. Anim. Genet. 43, 72-80.
- Hozé et al. 2013. Genet. Sel. Evol. 45, 33.
- Purcell et al. 2007. Am. J. Hum. Genet. 81, 559-575.
- Raadsma et al. 1997. The genetics of sheep. 199-224. (ed. L Piper and A Ruvinsky)
- Roshyara et al. 2014. BMC Genet. 15, 88
- Browning & Browning, 2009. Am. J. Hum. Genet. 84, 210-223.
- Silva et al. 2012 Anim. Genet. 43, 63-71. CABI Publishing.
- Weng et al. 2013. Animal 7, 729-735.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Europeo *NematodeSystemHealth* del programa Marie Curie-ITN (Ref. FP7-PEOPLE-2010-ITN #264639) y el proyecto LE245A12-2 financiado por la Junta de Castilla y León. B. Gutierrez-Gil es investigadora contratada a través del programa “Ramón y Cajal” del Ministerio de Economía y Competitividad.

GWAS ANALYSIS FOR GASTROINTESTINAL NEMATODES RESISTANCE TRAITS USING IMPUTED HIGH DENSITY CHIP GENOTYPES IN SHEEP

ABSTRACT: The aim of this study was to identify genomic regions influencing the serum levels of Immunoglobulin A (IgA), an indicator trait of resistance to gastrointestinal nematode (GIN) infections in Spanish Churra dairy sheep. With this aim, we performed a Genome-wide Association Study (GWAS) based on imputed genotypes for the Ovine High Density (HD)-chip for a population of 1,686 animals belonging to 16 different half-sib families. The whole population, including the 16 sires and their daughters had available genotypes for the *Ovine 50K-chip*. The imputation process was based on the 240 animals of the resource population that had been genotyped for the HD-chip. We estimated the accuracy of imputation, using only the genotypes available for the reference population based on a masking strategy designed to avoid any bias in the accuracy estimation. The GWAS identified a significant SNP at the 5% chromosome-wise level, located on OAR15. As complementary approaches, future analyses will exploit the linkage analysis and combined linkage disequilibrium with linkage analysis to exploit the half-sib structure of the studied resource population.

Keywords: sheep, parasite resistance, imputation, GWAS

QTL CON INFLUENCIA SOBRE EL RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN EL GANADO OVINO: ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN UTILIZANDO DATOS DE SECUENCIACIÓN GENÓMICA

Gutierrez-Gil, B.¹, Esteban-Blanco, C.^{1,2} y Arranz, J.J.¹

¹ Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. ² Fundación Centro de Supercomputación de Castilla y León, Campus de Vegazana, 24071, León. Email: bgutg@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La mastitis subclínica constituye un importante problema a los que se enfrentan las explotaciones de ganado ovino lechero, ya que, además de influir en la productividad global de la explotación, afecta al bienestar animal. El recuento de células somáticas (SCS) se considera un carácter indicador de la resistencia a la mastitis subclínica. La heredabilidad descrita para este carácter en ganado ovino es relativamente baja con valores que oscilan entre 0,03 y 0,11 en Churra (Othmane et al., 2002) y hasta 0.13 en Lacaune (Rupp et al., 2003). Así, la mejora genética del carácter SCS se vería altamente favorecida por la utilización de información genómica, como la derivada de los estudios de detección de QTL, cuyo objetivo final es la identificación de variantes genéticas con efecto directo sobre el fenotipo de interés. En una población comercial de raza Churra, nuestro grupo realizó un primer barrido genómico basado en 181 marcadores microsatélites mediante el cual se identificó un único QTL significativo al nivel *chromosome-wise* para el carácter SCS en el cromosoma ovino (OAR) 20 (Gutiérrez-Gil et al., 2007). Actualmente, la disponibilidad tanto de una secuencia de referencia del genoma ovino de alta calidad (oar_v3.1), como de herramientas genómicas como los Chips de SNPs de media y alta densidad incrementa la eficiencia de los estudios de localización de QTL realizados en esta especie. Además, el progresivo abaratamiento de las nuevas técnicas de secuenciación posibilitan la obtención de la secuencia completa de un genoma a un precio asequible, permitiendo el diseño de estudios que faciliten la identificación de posibles mutaciones causales o QTN que explican los efectos QTL previamente identificados (Ron y Weller, 2007). En este estudio presentamos un análisis de ligamiento realizado con el chip ovino de 50K en una población independiente de la misma raza que la población analizada por Gutierrez-Gil et al. (2007). Para el QTL identificado con mayor apoyo estadístico y que confirma los resultados anteriores, se presentan un análisis preliminar de la secuenciación masiva del genoma de un trío de muestras formado por un padre heterocigoto y dos de sus hijas seleccionadas para estudiar a máxima resolución la segregación de este QTL e identificar los polimorfismos que podrían ser candidatos a QTN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales, genotipos y fenotipos: La población objeto de estudio incluyó un total de 1.670 ovejas distribuidas en 16 familias de medio-hermanas del Núcleo de Selección de ANCHE (Asociación de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Churra), además de los 18 machos cabeza de pedigrí. Todos los animales fueron genotipados con el chip ovino de 50K. Tras el control de calidad de los datos brutos, llevado a cabo según el protocolo descrito por García-Gámez et al. (2013), un total de 43.613 SNP localizados en los 26 autosomas ovinos quedaron disponibles para análisis posteriores. El fenotipo analizado fue el logaritmo del recuento de células somáticas (SCS). Como variable dependiente del análisis de ligamiento, 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, teniéndose también en cuenta la precisión de la estimación en función del número de medidas repetidas disponibles para cada animal. El mapa genético utilizado para el análisis se basó en la última versión de la secuencia de referencia del genoma ovina (Ovine Assembly v3.1, disponible en Ensembl), utilizando la equivalencia 1 Mb \approx 1 cM para convertir distancias físicas en distancias genéticas.

Detección de QTL: El análisis de ligamiento de los 26 autosomas ovinos a nivel de toda la población (*across-family*) y para familias individuales se realizó con el programa *QTLMap* (Filangi et al., 2010), siguiendo el procedimiento descrito por García-Gámez et al. (2013). A partir de un test de 1.000 permutaciones se determinaron los umbrales de significación a

nivel *chromosome-wise* (p_c -value) y *genome-wise* (p_g -value). Para los QTL significativos identificados se calculó el intervalo de confianza (IC) mediante el método 1-LOD drop-off (Lander y Botstein, 1989). Para una de las familias segregantes del único QTL detectado al nivel *genome-wise*, se seleccionaron tres muestras para ser sometidas a secuenciación completa del genoma (Trio-QTL). Dichas muestras incluyeron el padre segregante (*Qq*) y dos de sus hijas con fenotipos divergentes extremos para el carácter SCS (*QQ vs qq*) en correspondencia con genotipos alternativos en homocigosis para los marcadores incluidos en el intervalo de confianza del QTL. Para dicha selección, se tuvo en cuenta la fase de los marcadores genotipados en la región del IC del QTL a nivel intrafamiliar obtenida con el programa PHASEBOOK (Dualphase; Druet y Georges, 2010).

Análisis de datos de secuenciación masiva: La secuenciación de las muestras del Trio-QTL se llevó a cabo mediante la tecnología *paired-end* de Illumina utilizando un secuenciador HiSeq2500. Brevemente, los pasos del análisis hasta la identificación de las variantes fueron: (1) Control de calidad de las lecturas utilizando el programa *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). (2) Alineamiento de las muestras frente al genoma de referencia utilizando el *Burrows-Wheeler-Aligner* o *BWA* (Li y Durbin, 2009). (3) Extracción de lecturas no mapeadas con *SAMtools* (Li et al. 2009) e indexado del alineamiento generado anteriormente. (4) Ordenamiento de las lecturas por coordenadas, marcado de duplicados y otras manipulaciones realizadas con el programa *Picard* (<http://broadinstitute.github.io/picard>) (5) Estadísticas básicas con *BAMUtil* (BamUtil – Genome Analysis Wiki) y sobre el estado de las lecturas con *SAMtools*. (6) Identificación de variantes a lo largo de todo el genoma: en este paso se utilizaron dos softwares, *SAMtools* (*mpileup*) y *GATK* (HaplotypeCaller) (Genome Analysis Toolkit; McKenna et al. 2010), con el fin de comparar los resultados y seleccionar las variantes identificadas por dos aproximaciones diferentes. Finalmente, se realizó el análisis de anotación funcional con el programa *Ensembl Variant Effect Predictor* (VEP) (McLare et al., 2010), únicamente para las variantes localizadas en el IC estimado para el QTL segregante en el trío, y cuyos genotipos en la tres muestras analizadas se corresponden con el patrón de segregación del QTL (*Qq* en el padre; *QQ* y *qq* en las hijas de menor y mayor valor de SCS, respectivamente).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de ligamiento realizado para el carácter SCS en la población de Churra analizada identificó dos QTL a nivel de significación del 5% *chromosome-wise* en OAR5 (max LRT en 77,99 cM; IC: 74,9-81,5 cM), y OAR25 (39,48 cM; IC: 38,6-41,7), y un QTL a nivel 5% *genome-wise* localizado en OAR20 (21,52 cM; IC:20,9-23,8) (Figura 1). Sólo una familia resultó significativa para cada uno de los QTLs identificados a nivel *chromosome-wise*, mientras que tres familias fueron identificadas como segregantes para el QTL en OAR20. De una de estas tres familias se seleccionaron los animales del Trio-QTL para realizar el análisis de secuenciación masiva.

Los ficheros brutos de secuencias contenían 395.439.600, 515.388.126 y 560.017.452 lecturas. Los resultados del control de calidad de todas las secuencias utilizadas fueron considerados como óptimos y no fue necesario realizar el proceso de recorte o *trimming*. La *pipeline* desarrollada para el análisis con *GATK* incluyó un proceso de eliminación de duplicados, que constituyeron como media el 7% de las lecturas iniciales. El número de variantes detectadas a lo largo de todo el genoma (ficheros tipo "VCF") por el *GATK* y *SAMtools* fueron de 22.051.464 y 20.973.384, respectivamente. Tras el primer filtrado de variantes, seleccionando aquellas incluidas en la región entre 14,2 y 24,2 Mb del OAR20 se seleccionaron un total de 69.898 variantes identificadas por *GATK*, y de 67.297 identificadas por *SAMtools*. Posteriormente se realizó una selección por genotipo (seleccionando las variantes que cumplían el patrón de segregación del QTL), eliminándose también aquellas variantes localizadas en las regiones intergénicas. De esta manera se seleccionaron un total de 6.713 y 6.721 con *GATK* y *SAMtools*, respectivamente. Finalmente, de todas las variantes identificadas, se realizó una primera selección de aquellas con consecuencias biológicas importantes (codón de parada, mutaciones que afectan a la pauta de lectura y mutaciones de un solo nucleótido). El número total de mutaciones detectadas por ambos protocolos fue de 15 (10 en común, 3 exclusivas a *GATK* y 2 exclusivas a *SAMtools*), localizadas en un total de 11 genes. En el momento actual se están analizando todas las

variantes genéticas con objeto de verificar el papel funcional de cada una de ellas y las consecuencias de los diferentes polimorfismos sobre el carácter recuento de células somáticas v. por lo tanto de resistencia a la mastitis subclínica en el ganado ovino.

SCS (LA)

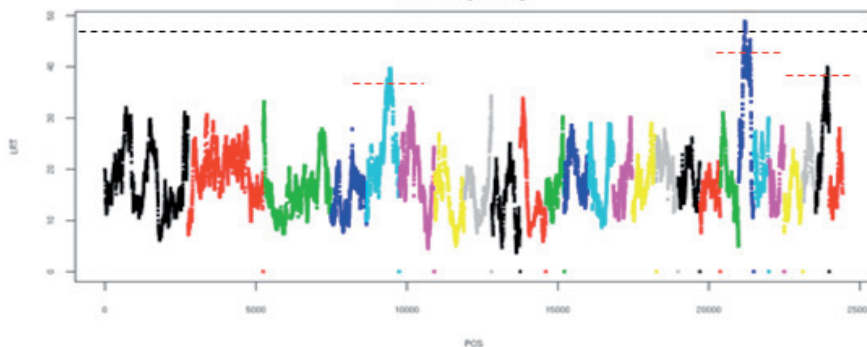


Figura 1. Resultados del análisis de ligamiento (valores LRT) para el carácter SCS realizado en la población comercial de ovejas Churra analizada en este estudio. Las líneas horizontales discontinuas representan los umbrales de significación del 5% chromosome-wise (rojo) y el umbral de significación del 5% genome-wise (negro), obtenidos por permutaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Druet & Georges, 2010. *Genetics* 184, 789-798.
- García-Gámez et al. 2013. *J. Dairy Sci.* 96, 6059-6069
- Gutiérrez-Gil et al. 2007. *J. Dairy Sci.* 90, 422-426.
- Lander & Botstein, 1989. *Genetics.* 121, 185-199.
- Li & Durbin, 2009. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.
- Li et al. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.
- Mckenna et al. *Genome Res.* 20, 1297-1303.
- McLaren et al. 2010. *Bioinformatics* 26, 2069-2070.
- Othmane et al. 2002. *Genet. Sel. Evol.* 34, 581-96.
- Ron & Weller, 2007. *Anim. Genet.* 38, 429-439.
- Rupp et al. 2003. *J. Dairy Sci.* 86, 1476-81.

Agradecimientos: Este trabajo se incluye dentro del proyecto Nacional AGL2012-34437 financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). B. Gutiérrez-Gil es investigadora contratada a través del programa “Ramón y Cajal” del MINECO.

QTLs INFLUENCING SOMATIC CELL COUNT IN SHEEP: SEGREGATION ANALYSIS USING WHOLE GENOME SEQUENCING TRIO ANALYSIS

The present study summarizes the linkage analysis performed in a commercial population of Spanish Churra sheep genotyped with the *Ovine SNP50 BeadChip* to identify QTL influencing SCS. Two QTL were detected at the 5% chromosome-wise level on OAR5 and OAR25, whereas, one other QTL located on OAR20 reached the 5% genome-wise significance. For the most significant QTL, which appears to confirm a QTL previously described in another population of Churra sheep, we selected three samples based on their assumed QTL genotypes (Trio-QTL samples) to be analysed by Whole Genome Sequencing (WGS). The Trio-QTL involved a segregating sire (*Qq*) and two daughters showing alternative marker phases, along the confidence interval of the target QTL, which should show correspondence with extreme divergent phenotypes (the *QQ* daughter has two copies of the chromosome related to mastitis resistance and a very low value for the SCS trait; the *qq* daughter has two copies of the chromosome related to susceptibility, and an extreme high value for the SCS trait). Preliminary results of the analysis of the massive sequencing performed are presented here.

Keywords: SNP-chip, subclinical mastitis, sheep, massive sequencing

REGIONES DEL GENOMA ASOCIADAS CON TAMAÑO DE CAMADA EN CERDAS IBÉRICAS TORBISCAL

Rodríguez, MC., Barragán, C., Núñez, Y., García, F. y Silió, L.
Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid
E-mail: valdo@inia.es

INTRODUCCIÓN

El tamaño de camada en cerdos es un carácter de gran importancia económica para el que los programas de mejora solo recientemente han tenido un cierto éxito, atribuible al intenso empleo del modelo animal y a la utilización de alelos de razas hiperprolíficas de origen asiático. La evaluación basada en registros obtenidos en hembras parientes de los candidatos da lugar a que los lechones de una camada compartan una misma estima de su mérito genético. Los avances en genómica permiten desarrollar nuevas herramientas que apoyen la selección convencional. La utilización de tests genéticos permitiría la preselección temprana de los candidatos basadas en estimas genómicas individuales de su valor mejorante, reduciendo el número de plazas de testaje y los riesgos de consanguinidad. El genotipado a gran escala proporciona un elevado número de polimorfismos nucleotídicos (SNPs) útiles para identificar regiones genómicas asociadas a caracteres de interés. Las técnicas genómicas permiten además un mejor conocimiento de la base genética de los caracteres de interés. En la base de datos *PigQTLdb* (<http://www.animalgenome.org/>) figuran 137 QTLs relacionados con el número de lechones nacidos por camada y se han descrito algunos genes/polimorfismos asociados a este carácter, aunque a menudo con efectos discrepantes en diferentes líneas porcinas. La selección por tamaño de camada presenta un notable interés en cerdos ibéricos dada su baja prolificidad y el uso obligatorio de madres de esta raza de acuerdo con la normativa oficial que regula la producción de animales de tipo ibérico. La singularidad genética de esta raza (San Cristobal et al., 2006) incluye la ausencia de introgresión en la misma de genes de origen asiático (Alves et al., 2009; Pérez-Montarelo et al. 2015), por lo que el uso de herramientas genómicas obliga a una investigación específica tanto en los aspectos aplicados como en los más básicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y Genotipos. Mediante el *Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA), se han genotipado 435 reproductoras Ibéricas de la estirpe Torbiscal. Tras el control de calidad de los datos se descartaron los SNPs con $MAF < 0,05$, los localizados en los cromosomas X e Y, y los no mapeados (Sscrofa 10.2), reteniendo un total de 26.360. Se han utilizado registros del número total de lechones nacidos obtenidos en 1.242 camadas, con un número medio de lechones nacidos de $8,47 \pm 2,32$. La genealogía completa utilizada consta de 4.882 trios individuo-padre-madre.

Análisis de datos. Los efectos de los SNPs sobre el tamaño de camada se estimaron, utilizando el programa Qxpak v.5.02 (Pérez-Enciso y Misztal, 2011), mediante un modelo de repetibilidad que incluía, junto a los efectos poligénicos y permanente, el ordinal de parto de la cerda (1, 2, 3, 4, 5 y ≥ 6), la estación de parto (4 niveles) así como los efectos aditivo y dominante del SNP. Se realizó una corrección del umbral de significación estadística de acuerdo con Benjamini y Hochber (1995) asumiendo una $FDR < 0,05$ y un número efectivo de 16.399 tests independientes (Moskvina y Schmidt, 2008). En el SNP más significativo de cada región se realizó un contraste separado de los efectos aditivo (*a*) y dominante (*d*) utilizando un nivel de significación nominal $p < 0,01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han detectado un total de 37 SNPs asociados al número total de lechones con un *p*-value $< 1,28 \times 10^{-4}$ correspondiente a $FDR < 0,05$ (Figura 1). Estos SNPs están localizados en 14 regiones QTL de nueve cromosomas (Tabla 1). Para depurar los contrastes basados en un modelo sobreparametrizado, en la relación anterior no se han incluido siete SNPs que, superando el umbral de significación, no presentan los tres genotipos necesarios para la estimación conjunta de efectos *a* y *d*. En trabajos previos se han descrito QTLs para este

carácter en nueve de estas catorce regiones, situadas en los cromosomas 1, 3, 4, 7, 11, 13, 15 y 18. No hay evidencia previa publicada de presencia de QTLs para nacidos por camada en las regiones 1-1, 1-4, 9-1, 9-2 y 11-2, aunque en algunas de ellas hemos detectado los efectos aditivos más importantes. En la tabla se presentan los efectos del SNP más significativo de cada región. Tres de estos presentan aditividad y dominancia, cuatro aditividad y siete dominancia. Sorprende la elevada proporción de QTLs con efectos dominantes detectados, aunque como se ha señalado la partición de efectos genéticos aditivos y dominantes depende de la extensión del desequilibrio de ligamiento y de las frecuencia de los marcadores y QTLs investigados (Heuer y Thaller, 2014). De acuerdo con la magnitud de los efectos estimados y del porcentaje de la varianza fenotípica asociado a los distintos SNPs (Tabla 1) parecen especialmente relevantes los efectos aditivos en las regiones 1-4 y 9-2 y los dominantes en las regiones 1-2 y 11-2. El porcentaje total de la varianza fenotípica atribuible a los SNPs con efectos significativos aditivos asciende al 6,6% y el de los SNPs con dominancia sería de un 7,8%. Estos valores son meramente descriptivos pues la partición de la varianza en contribuciones específicas de SNPs no es del todo correcta al depender del LD entre SNPs y entre SNPs y QTLs, que es generalmente desconocido (Gianola et al., 2013; de los Campos et al., 2014). Por otra parte es necesario comprobar si los efectos significativos detectados en esta línea de cerdos ibéricos se mantienen en otras poblaciones de esta raza.

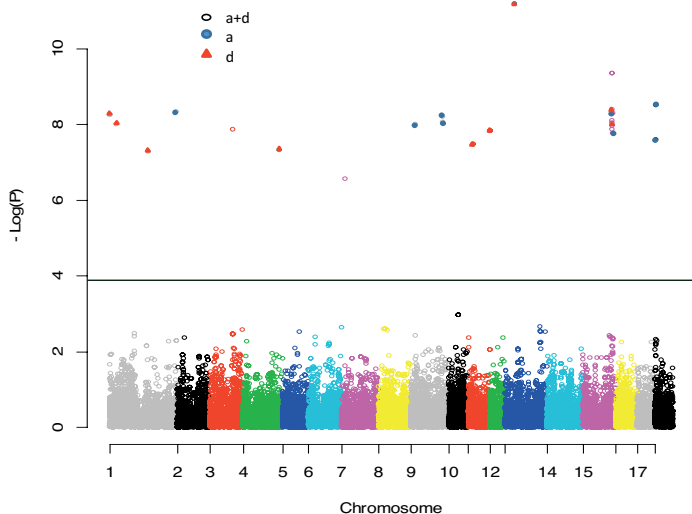


Figura 1. Resultados del análisis de asociación para el número de lechones por camada con modelos que contemplan aditividad y dominancia (○), aditividad (●) o dominancia (▲).

El interés final de nuestro trabajo es profundizar en el conocimiento de los genes responsables de procesos metabólicos relacionados con el tamaño de camada en cerdos ibéricos. En este sentido cabe señalar que en tres de las regiones significativas mapean genes que se han relacionado con el número de lechones. En la región 1-2, para la que hay descritos varios QTLs, mapea el receptor de estrógenos α que ha sido objeto de números estudios en distintas razas porcinas (Alfonso, 2005). En la región 13-1 mapea el cluster de genes *ITIH1*, 2 y 4 (*inter- α -trypsin inhibitor heavy chains*) pertenecientes a una superfamilia inhibidora de proteasas secretadas por el endometrio y que juegan un papel importante durante la adhesión del embrión a la superficie uterina (Geiser et al., 2003). Balcells et al. (2011) encontraron efectos significativos de algunos polimorfismos de estos genes en un cruce Ibérico x Meishan. En la región 15-1 mapea el gen *EPHA4* (*erythropoietin-producing hepatocellular A4*) para el que se han descrito asociación de varios polimorfismos de este gen con tamaño de camada en diversas razas de cerdos (Fu et al., 2012).

Tabla 1. Regiones QTL para tamaño de camada, efectos aditivos (*a*) y dominantes (*d*) de los SNPs más significativos y porcentaje de la varianza fenotípica asociada a los mismos

Chr	Región	SNP más significativo					
		MAF	$-\log_{10}(P)$	<i>a</i>	<i>d</i>	$\sigma^2_{\text{SNP}a}$ [§]	$\sigma^2_{\text{SNP}d}$ [§]
1	1-1	0,25	8,26	-0,01	0,65*	0,72	1,10
1	1-2	0,39	8,00	0,30	0,57*	0,28	1,41
1	1-3	0,17	7,29	-0,34	0,82*	0,22	1,03
1	1-4	0,49	8,34	-0,48*	0,10	2,17	0,05
3	3-1	0,35	7,87	0,23*	0,38*	1,08	0,59
4	4-4	0,32	7,32	0,15	-0,60*	0,04	1,30
7	7-1	0,42	6,56	-0,18*	-0,33*	0,52	0,48
9	9-1	0,22	8,00	0,46*	0,12	1,03	0,04
9	9-2	0,46	8,06	-0,43*	-0,38	2,08	0,68
11	11-1	0,30	7,47	-0,15	0,60*	0,06	1,24
11	11-2	0,39	7,83	-0,02	0,57*	0,09	1,40
13	13-1	0,08	11,19	0,17	0,82*	0,74	0,26
15	15-1	0,11	9,34	-0,24*	0,52*	1,56	0,19
18	18-1	0,47	7,60	-0,36*	0,30	1,36	0,42

[§] Porcentaje de la varianza fenotípica explicada por la varianza aditiva o dominante del SNP más significativo de cada región

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alfonso L., 2005. Genet. Sel. Evol. 37: 417. • Alves E. et al. 2009. Animal 3: 1216-1223. • Benjamine Y & Hochber Y. 1995. JR Statist Soc B 57:289-300. • Balcells I. et al. 2001. Anim. Reprod. Sci. 128: 85-92. • de los Campos G. et al. 2014. 10th WCGALP. • Fu Y. et al. 2012, Mol. Biol. Rep. 39: 2689-2696. • Gianola D. et al. 2013. TAG 126: 1457-1472. • Geiser et al., 2003. Reproduction 126: 621-627. • Heuer y Thaller, 2014. 10th WCGALP. • Moskvina V. & Schmidt K.M. 2008. Genet. Epidemiol. 32: 567-573. • Pérez-Enciso M. & Misztal I. 2011. BMC Bioinformatics. 12: 202. • Pérez-Montarelo D. et al. J. Appl. Genet. (en revisión). • San Cristobal M. et al. 2006. Anim. Genet. 37: 189-198.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el proyecto RTA2011-00113-00-00 (cofinanciación FEDER). Agradecemos muy especialmente a Jaime Rodríguez así como la colaboración del personal encargado de los animales en el CIA 'Dehesón del Encinar' (Oropesa, Toledo).

GENOMICS REGIONS ASSOCIATED WITH LITTE SIZE IN IBERIAN SOWS

ABSTRACT: Selection for litter size is required in Iberian pigs due to their low prolificacy and the mandatory use of Iberian sows according to the official regulation of this production. Genetic tests based on markers clearly associated to the trait may be convenient to reinforce conventional selection. The results of a genome wide scan allowed the detection of genomic regions associated with the number of piglets born per litter in 14 regions of the following nine chromosomes: 1, 3, 4, 7, 11, 13, 15 and 18. Three of these regions, in chromosomes 1, 13 and 15, correspond to genes (*ESRα*, *ITH1* cluster and *EPHA4*) with associations with litter size reported in other breeds. The new effects detected in five regions require additional research on underlying candidate genes.

Keywords: Litter Size, GWAS, Iberian sows

DETECCIÓN DE eQTLs ASOCIADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL MÚSCULO PORCINO

Puig-Oliveras, A.^{1,2}, Revilla, M., Martínez, A.M., Folch, J.M., Ballester, M.

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Barcelona. ²Plant and Animal Genomics, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), 08193 Bellaterra, Barcelona
anna.puig@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

La detección de *quantitative trait loci* asociados con los niveles de expresión génica (eQTLs) se ha propuesto como una buena estrategia para profundizar en el estudio de la arquitectura genética de los caracteres complejos (Schadt *et al.*, 2003). Podemos clasificar como *cis*-eQTLs aquellos que mapean cerca de la posición del gen cuya expresión ha sido analizada y *trans*-eQTLs aquellos identificados en otras regiones del genoma. A nivel biológico, la diferencia puede ser debida a que los niveles de transcripción estén afectados por el resultado de una mutación en el mismo gen (*cis*-eQTLs) o bien por otros factores que actúen lejos del gen (*trans*-eQTLs). Esta técnica permite además la identificación de zonas implicadas en la regulación de varios genes (eQTL *hotspots*).

La cantidad y composición de la grasa en el músculo están estrechamente relacionadas con la terneza y el sabor de la carne del cerdo, siendo estos dos caracteres de especial interés para la industria alimentaria (Wood *et al.*, 2008). Se trata de caracteres complejos, determinados 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 relacionados con estos caracteres.

El cruce Ibérico × Landrace (IBMAP; Pérez-Enciso *et al.*, 2000) fue generado para el estudio de caracteres relacionados con el crecimiento, engrasamiento y composición de la grasa permitiendo la identificación de varios genes candidatos (Óvilo *et al.*, 2002; Estellé *et al.*, 2005; Mercadé *et al.*, 2005; Estellé *et al.*, 2006; Fernández *et al.* 2012; Ramayo-Caldas *et al.*, 2012a; Ramayo-Caldas *et al.*, 2012b; Corominas *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2013; Pena *et al.*, 2013; Puig-Oliveras *et al.*, 2014a; Puig-Oliveras *et al.*, 2014b; Ramayo-Caldas *et al.*, 2014; Revilla *et al.*, 2014). El presente trabajo tiene como objetivo profundizar en el estudio de genes y rutas reguladoras que juegan un papel clave en la determinación del contenido y composición de ácidos grasos en músculo mediante la detección de eQTLs asociados con genes del metabolismo lipídico en el músculo *Longissimus dorsi* de animales del cruce IBMAP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y genotipado: El material utilizado en este trabajo procede de un cruce entre 3 machos Ibéricos (Guadyrvas) con 31 hembras Landrace (Pérez-Enciso *et al.*, 2000). Cinco animales de la generación F1 fueron cruzados con 26 hembras 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 genotiparon los animales con el *Porcine SNP60K BeadChip* (Illumina) y se eliminaron aquellos SNPs con frecuencia alélica mínima (MAF) < 5%.

Extracción de ARN y análisis de la expresión génica: Se aisló el ARN total a partir de muestras de músculo de 114 animales utilizando el kit *RiboPure™* (Ambion). El ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop*) y fue convertido a ADNc utilizando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). El estudio de expresión se realizó utilizando el chip *Dynamic Array 48.48* (*Fluidigm*) en un sistema *BioMark* (*Fluidigm*). Se analizaron los niveles de expresión de 48 genes, 45 genes diana y 3 genes de referencia. Los datos fueron normalizados utilizando los dos genes endógenos más estables, *ACTB* y *TBP*.

Los datos de expresión fueron analizados con el programa *DAG Expression* (Ballester *et al.*, 2013). Se eliminaron aquellos animales con valores de expresión atípicos (*outliers*) y se comprobó la normalidad de los datos mediante el test *Shapiro-Wilk* (Remark 1995) de R (<http://R-project.org>). Para algunos genes los datos fueron normalizados aplicando el log₂ de los valores de RQ.

Análisis de asociación de los genotipos con los valores de expresión: El análisis se realizó mediante el programa Qxpak 5.0 (Pérez-Enciso y Misztal, 2011) con el modelo:

$$y_{ijklkm} = \text{Sexo}_i + \text{Lote}_j + \lambda_{ik}a_k + u_i + e_{ijklkm},$$

Donde: y_{ijklkm} es el valor fenotípico de cada individuo; Sexo_i y Lote_j son los efectos fijos (con 2 y 5 niveles, respectivamente); λ_{ik} corresponde al genotipo del SNP k para el individuo i ; siendo $\lambda = -1(\text{aa}), 0(\text{Aa}), +1(\text{AA})$; a_k es el efecto aditivo de sustitución alélica del SNP k ; u_i el efecto infinitesimal con distribución $N(0, A\sigma_u)$ donde A es la matriz de parentesco y σ_u la varianza genética aditiva; y e_{ijklkm} es el residuo.

La corrección de los p-valores se realizó con la librería de R q-value (Storey y Tibshirani, 2003) considerando como significativos aquellos valores con un q-valor $<0,05$.

Anotación: Los eQTLs identificados fueron clasificados como *cis* cuando se encontraban a una distancia de ± 1 Mb del inicio o final de transcripción del gen y *trans* los situados a una distancia superior a 1 Mb. También se identificaron las regiones *hotspots* de eQTLs. Los intervalos de los eQTLs se definieron como ± 1 Mb de los SNPs más significativos y se anotaron mediante la herramienta *BioMart* de Ensembl (<http://www.ensembl.org>) utilizando la última versión del genoma de referencia porcino *Sscrofa10.2*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 45 genes relevantes para el metabolismo lipídico fueron seleccionados teniendo en cuenta trabajos anteriores de nuestro grupo y/o identificados por otros autores mediante búsqueda bibliográfica. Con los valores de expresión de los 45 genes en 114 animales pertenecientes al retrocruce BC1_LD (25% Ibérico y 75% Landrace) se realizó un estudio de asociación genómico utilizando un total de 40.586 SNPs que pasaron el control de calidad.

El eGWAS permitió la identificación de un total de 402 eSNPs localizados en 28 regiones cromosómicas en SSC1, SSC2, SSC3, SSC4, SSC5, SSC6, SSC8, SSC9, SSC10, SSC11, SSC13, SSC15 y SSC16, para un total de 11 genes: *ACSM5*, *CROT*, *FABP3*, *FOS*, *HIF1AN*, *PIK3R1*, *PLA2G12A*, *MGLL*, *IGF2*, *NCOA1* y *PPARA* (FDR $<0,05$). De los 402 eSNPs identificados, 53,75% se localizaron en regiones intergénicas, 32,5% en intrones, 6,25% en la región 5' flanqueante, 5% en la región 3' flanqueante, 0,75% en la región 3'UTR, 0,25% en la región 5'UTR, 1% en la región codificante de un gen determinando mutaciones sinónimas y 0,5% determinando mutaciones no sinónimas.

Los cromosomas SSC2, SSC6, SSC8 y SSC9 fueron los que más eQTLs presentaron (14 sobre 28). La mayoría de los eQTLs se identificaron en *trans* (25 sobre 28) observándose 4 genes asociados con más de un *trans*-eQTL. Tres de los eQTLs se encontraron en *cis* (p-valor=7,12 $\times 10^{-4}$, p-valor=2,20 $\times 10^{-9}$, p-valor $<1,00\times 10^{-25}$), sugiriendo la presencia de una mutación en el mismo gen afectando directamente a su expresión. Además, se identificaron dos *hotspots* de eQTLs en *trans*, uno alrededor de las 289 Mb en el cromosoma 1 regulando la expresión de *ACSM5* y *MGLL* y otro aproximadamente en la posición 117 Mb del cromosoma 9 afectando a la expresión de los genes *PLA2G12A* y *HIF1AN*.

La anotación de los intervalos de eQTLs permitió la identificación de genes candidatos que pueden estar asociados con los fenotipos de expresión analizados. En la región *hotspot* del cromosoma 9 se encuentra el gen *PIK3CG* que codifica para una fosfatidilinositol 3-quinasa que actúa en rutas del metabolismo lipídico (Kobayashi *et al.*, 2011). Por otra parte, el fenotipo de expresión del gen *MGLL* está *trans*-asociado con el SNP ASGA0020267 (p-valor=4,17 $\times 10^{-5}$) próximo al gen *CYP7A1* involucrado en la síntesis del colesterol y otros lípidos.

Siete de los 28 eQTLs detectados concuerdan con regiones GWAS para la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular identificados en el mismo material animal (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012a), siendo candidatos potenciales a determinar los caracteres estudiados.

Los resultados obtenidos representarán un avance importante en la identificación de genes y variantes genéticas implicadas en la determinación del contenido y composición intramuscular de ácidos grasos y, por tanto, en la calidad de la carne porcina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ballester, M., Cerdón, R., Folch, J.M. 2013. PLoS One 8(11):e80385. • Corominas, J., Ramayo-Caldas, Y., Puig-Oliveras, A., *et al.*, 2013. BMC Genomics 14:842. • Estellé, J., Mercadé, A., Noguera J.L., *et al.*, 2005. J. Anim. Sci. 83(12):2723-8. • Estellé, J., Pérez-Enciso, M., Mercadé, A., *et al.*, 2006. Anim. Genet. 37(6):589-91. • Fernández, A.I., Pérez-Montarelo, D., Barragán, C., *et al.*, 2012. BMC genet. 13:41. • Kobayashi, N., Ueki, K., Okazaki, Y., *et al.*, 2001. PNAS 108(14):5753-5758. • Mercadé, A., Sánchez, A., Folch, J.M., *et al.*, 2005. J. Animal Breeding and Genetics 122, 161-164. • Óvilo, C., Oliver, A., Noguera, J.L., *et al.*, 2002. Genet. Sel. Evol. 34:465-479. • Muñoz, M., Rodríguez, M.C., Alves, E., 2013. BMC Genomics 14:845. • Pena, R.N., Noguera J.L., Casellas, J., *et al.*, 2013. Anim. Genet. 44(6):648-80. • Pérez-Enciso, M., Clop, A., Noguera, J. L., *et al.*, 2000 J. Animal Sci. 78: 2525-31. • Pérez-Enciso, M. y Misztal, I. 2011. Bioinformatics 12:202. • Puig-Oliveras, A., Ramayo-Caldas, Y., Corominas, J., *et al.*, 2014a. PLoS One 9(7):e103668. • Puig-Oliveras, A., Ballester, M., Corominas, J., *et al.*, 2014b. PLoS One 9(12):e114862. • 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. • Ramayo-Caldas, Y., Ballester, M., Fortes, M.R.S., *et al.*, 2014. BMC Genomics 15:232. • Revilla, M., Ramayo-Caldas, Y., Castelló, A., *et al.*, 2014. Genet. Sel. Evol. 46:28. • Schadt, E.E., Monks, S.A., Drake, T.A., *et al.*, 2003. Nature 422, 297-302. • Storey, J.D., y Tibshirani, R. 2003. PNAS 100(16):9440-9445 • Remark, A.S., 1995. Journal of the Royal Statistical Society 44(4):547-551. • Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., *et al.*, 2008. Meat Science 78:343-358.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-29821-C02 (Ministerio de Economía y Competitividad). A. Puig-Oliveras ha sido financiada con una beca de la Universidad Autónoma de Barcelona (PIF, 458-01-1/2011). M. Revilla ha sido financiado con una beca de Formació i Contractació de Personal Investigador Novell (FI-DGR) de la Generalitat de Catalunya (ECO/1639/2013). Agradecemos a J.L. Noguera (IRTA) su contribución en la obtención del material animal.

GENOME WIDE IDENTIFICATION OF EXPRESSION QUANTITATIVE TRAIT LOCI FOR ADIPOSITY-RELATED GENES DETERMINING PIG FATNESS TRAITS

ABSTRACT: The aim of this work was to study the genetic basis of the expression of genes affecting the lipid metabolism in the swine muscle (*Longissimus dorsi*) in an Iberian × Landrace cross. The detection of quantitative trait loci associated with the expression level of genes (eQTLs) has been proposed as a good strategy to reduce the list of candidate genes affecting quantitative traits in segregating populations. Here, we analyzed the expression level of 45 genes in 114 animals. The eGWAS identified 402 eSNPs located in 28 chromosomal regions on SSC1, SSC2, SSC3, SSC4, SSC5, SSC6, SSC8, SSC9, SSC10, SSC11, SSC13, SSC15, and SSC16 and associated with 11 genes *ACSM5*, *CROT*, *FABP3*, *FOS*, *HIF1AN*, *PIK3R1*, *PLA2G12A*, *MGLL*, *IGF2*, *NCOA1*, and *PPARA*. Three out of 28 eQTLs were classified as cis-acting eQTLs whereas the remaining 25 eQTLs have *trans* regulatory effects on the gene expression traits. A total of 46,25% of the 402 eSNPs identified were located within a gene. Moreover, we identified two hotspots of eQTLs on SSC1 and SSC9. The obtained results will increase our knowledge in the functional mechanisms implicated in complex traits and will allow for the identification of genes and genetic variants involved in the determination of intramuscular fat content and fatty acid composition.

Keywords: eQTL, *Longissimus dorsi*, transcriptome, lipid metabolism

EFFECTOS ADITIVOS, DOMINANTES Y EPISTÁTICOS DE LOS GENES *SCD* Y *LEPR* SOBRE EL CONTENIDO Y LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA EN CERDO

Gol^{1*}, S., Ros-Freixedes¹, R., Tor¹, M., Pena¹, R. N., Rothschild², M. F. y Estany¹, J.
¹Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida - Agrotecnio Center, Avenida Alcalde Rovira Roure 191, 25198, Lleida. ²Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, IA, USA. *sgol@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El contenido de grasa intramuscular (GIM) y su composición son dos caracteres que influyen la calidad de la carne de cerdo y por esta razón cada vez son más relevantes en los programas de mejora. Los resultados de un reciente estudio de asociación genómica en una población Duroc (Ros-Freixedes et al., 2014) indican la existencia de dos loci, uno en el gen del receptor de la leptina (*LEPR*; SSC6) y otro en el de la esteroil-CoA desaturasa (*SCD*; SSC14), que afectan al contenido y a la composición de la grasa, respectivamente. En un estudio previo se mostró la existencia de un haplotipo en la región promotora del gen *SCD* asociado con la actividad desaturasa, resultando en un incremento del porcentaje de grasa monoinsaturada (MUFA) sin modificar la cantidad de grasa total (Estany et al., 2014). Por contra, el gen *LEPR* afecta a la ingesta de pienso y al contenido graso de la canal, con un efecto indirecto sobre la composición en ácidos grasos de la grasa. El SNP *NM_001024587:g.1987C>T*, situado en el exón 14 de *LEPR*, provoca una disminución de la funcionalidad de *LEPR* (Óvilo et al., 2005). El objetivo del presente trabajo ha sido investigar los efectos aditivos, dominantes y epistáticos entre los genes *SCD* y *LEPR* en el contenido y la composición de la grasa en una línea de cerdos Duroc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal. Se han utilizado 971 machos castrados Duroc procedentes de 527 hembras y 134 machos. A todos ellos se les controló el peso (P180d) y el espesor de grasa dorsal (GD180d) a los 180 días de edad. Los cerdos se criaron en condiciones comerciales con alimentación *ad libitum*. Los cerdos se sacrificaron a los 210 días de edad y se les midió el peso de la canal (PC) y el espesor de grasa dorsal en canal (GDC). Se extrajo una muestra representativa del músculo *gluteus medius* para la determinación del contenido de GIM y del contenido de ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), incluyendo el ácido oleico (C18:1), y poliinsaturados (PUFA), que se analizaron por cromatografía de gases siguiendo la metodología descrita en Bosch et al. (2009). El número de animales y caracteres analizados en este experimento se detalla en la Tabla 1.

Genotipado. El ADN de estos cerdos fue extraído a partir de muestras de sangre mediante un protocolo estándar. El SNP *AY487830:g.2228T>C* de *SCD*, que forma parte del haplotipo descrito en Estany et al. (2014), fue genotipado mediante una qPCR en tiempo real (7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems) con un protocolo de discriminación alélica con sondas *TaqMan* alelo-específicas. El SNP *NM_001024587:g.1987C>T* de *LEPR* se genotipó usando el análisis High Resolution Melt (Luminaris Color HRM Master Mix, Thermo Scientific) en un termociclador a tiempo real (CFX-100, Bio-Rad).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante metodología bayesiana utilizando un modelo animal que incluyó, como factores sistemáticos, el lote (12 niveles), la covariable edad y los coeficientes ortogonales para los efectos aditivo, dominante y epistáticos. Los coeficientes ortogonales para los efectos genéticos fueron calculados usando el algoritmo propuesto por Álvarez-Castro y Carlborg (2007). El modelo se resolvió usando el programa TM (Legarra et al., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La distribución de los animales por genotipo es muy similar en ambos SNP. El alelo T presentó una frecuencia génica de 0,44 en *SCD* y de 0,42 en *LEPR*. Los efectos aditivos, dominantes y epistáticos entre los dos polimorfismos de *SCD* y *LEPR* se presentan en la Tabla 2. En concordancia con los resultados obtenidos en Estany et al. (2014), el efecto de sustitución del alelo T por C en *SCD* afectó favorablemente el contenido de MUFA y C18:1

(0,91 y 0,63%, respectivamente) y negativamente el de SFA (-0,90%), sin mostrar por otra parte evidencias de asociación con GIM y los caracteres de producción. En el caso del polimorfismo de *LEPR*, se encontró un efecto aditivo sobre el peso (0,81 y 0,85 kg para P180d y PC, respectivamente) y sobre GDC (0,42 mm). Además, se encontraron efectos aditivo y dominante sobre GD180d (1,04 y -1,01 mm, respectivamente), GIM (0,32 y -0,30%), SFA (0,64 y -0,46%) y PUFA (-0,54 y 0,29%). Estos resultados son consistentes con los estudios anteriores que asociaron el SNP de *LEPR* tanto con GD como con GIM en distintas razas y cruces de cerdo (Muñoz et al., 2011; Galve et al., 2012; Pérez-Montalero et al., 2012; Uemoto et al., 2012; López-Buesa et al., 2014), aunque solo en dos de ellos se encontraron evidencias de dominancia (Pérez-Montarelo et al., 2012, en Ibérico×Landrace, y Uemoto et al., 2012, en Duroc). Para GD180d y GIM, el efecto aditivo del alelo T fue similar en magnitud al dominante pero en sentido inverso, lo que sugiere que el polimorfismo en *LEPR* presenta un modo de acción génica de dominancia completa en la que el alelo T, que es el que favorece la deposición de grasa, es la forma recesiva.

La interacción más relevante entre los SNPs de *SCD* y *LEPR* se observó entre los efectos aditivos de *SCD* y el valor dominante de *LEPR*. En particular, se encontró un efecto epistático para PC (-2,21 kg) y GDC (-0,78 mm). El mismo efecto epistático afectó de forma inversa los contenidos de SFA (-0,38%) y PUFA (0,52%). López-Buesa et al. (2014) reportaron evidencias de epistasis entre *LEPR* y otros tres genes, aunque no entre estos tres últimos. Esto indicaría que *LEPR* actúa como un nodo de regulación de genes relacionados con la ingesta y el metabolismo lipídico. No se encontraron efectos epistáticos aditivo por aditivo. Comprender la interacción génica entre los genes *SCD* y *LEPR*, en el que uno afecta principalmente el contenido de grasa (*LEPR*) y el otro su composición en ácidos grasos (*SCD*), constituye un modelo sencillo pero muy interesante para profundizar en el mecanismo genético que regula el metabolismo y la deposición de la grasa, a la vez que puede ayudar a mejorar la toma de decisiones de selección que incluyan estos dos loci.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Castro, J.M. & Carlborg, O. 2007. Gen. 176: 1151–67.
- Bosch, L. et al. 2012. Meat Sci. 91: 358-363.
- Estany, J. et al. 2014. PLoS One. 9: e86177.
- Galve, C. et al. 2012. Lives Sci. 145: 145–152.
- Legarra, A. et al. 2008. Manual TM. <http://snp.toulouse.inra.fr/~alegarra/>
- López-Buesa, P. et al. 2014. Anim Gen. 45: 133-137.
- Muñoz, G. et al. 2011. Meat Sci. 88: 169-173.
- Óvilo, C. et al. 2005. Gen Res Cam. 88: 57-67.
- Pérez-Montarelo, D. et al. 2013. PLoS One. 8: e66398.
- Ros-Freixedes, R. et al. 2014. 10th World Cong Gen Lives Prod.
- Uemoto, Y. et al. 2012. Anim Sci J. 83: 375-385.

Agradecimientos: S. Gol es beneficiaria de una beca FPU (BES-2014-FPU13/04975). Proyecto financiado por el MINECO (AGL2012-33529).

Tabla 1. Número de cerdos (*n*) y media de los caracteres estudiados para cada combinación de los genotipos de *SCD* y *LEPR*

Carácter ¹	Genotipo <i>SCD/LEPR</i>								
	CC/CC	CC/CT	CC/TT	CT/CC	CT/CT	CT/TT	TT/CC	TT/CT	TT/TT
<i>n</i>	123	133	53	171	225	99	53	90	39
P180d, kg	109,4	109,8	108,5	107,5	108,7	109,6	108,5	107,8	108,7
PC, kg	96,3	98,2	96,9	95,3	97,5	98,9	96,2	95,7	97,6
GD180d, mm	18,0	18,0	20,3	17,8	18,3	20,6	18,1	17,5	19,9
GDC, mm	22,6	23,1	23,4	22,7	23,2	24,5	23,0	22,4	23,9
GIM, %	4,85	5,01	5,95	4,93	4,97	5,70	5,07	4,80	5,50
SFA, %	37,9	37,7	37,9	36,6	36,5	37,4	36,1	35,9	35,8
MUFA, %	48,3	48,4	48,4	49,5	49,7	49,7	50,8	50,3	51,2
C18:1, %	44,2	44,3	44,1	45,1	45,2	45,3	46,1	45,4	46,5
PUFA, %	13,9	13,8	13,7	13,9	13,8	12,8	13,1	13,8	13,0

¹Abreviaciones en el texto.

Tabla 2. Efectos aditivos, dominantes y epistáticos de los marcadores de *SCD* y *LEPR*

Carácter ¹		Efectos aditivo (a) ² y dominante (d)				Efectos epistáticos			
		a _{SCD}	d _{SCD}	a _{LEPR}	d _{LEPR}	a _{SCD} ^x a _{LEPR}	a _{SCD} ^x d _{LEPR}	d _{SCD} ^x a _{LEPR}	d _{SCD} ^x d _{LEPR}
P180d, kg	media	-0,19	0,27	0,81	-0,34	0,18	-1,20	1,38	0,34
	<i>P</i> (>0) ³	0,35	0,65	0,96	0,31	0,61	0,11	0,94	0,60
PC, kg	media	-0,23	0,64	0,85	0,42	0,61	-2,21	1,12	0,18
	<i>P</i> (>0)	0,30	0,85	0,97	0,76	0,85	0,01	0,90	0,56
GD180d, mm	media	-0,06	0,25	1,04	-1,01	0,02	-0,37	0,44	0,13
	<i>P</i> (>0)	0,37	0,86	>0,99	<0,01	0,54	0,13	0,92	0,62
GDC, mm	media	-0,09	0,29	0,42	-0,25	0,12	-0,78	0,30	-0,23
	<i>P</i> (>0)	0,29	0,90	>0,99	0,14	0,70	0,01	0,83	0,31
GIM, %	media	0,05	0,02	0,32	-0,30	-0,12	-0,12	-0,02	-0,02
	<i>P</i> (>0)	0,31	0,57	>0,99	0,01	0,15	0,23	0,45	0,46
SFA, %	media	-0,90	-0,03	0,64	-0,46	-0,03	-0,38	0,16	-0,21
	<i>P</i> (>0)	<0,01	0,42	>0,99	<0,01	0,40	0,02	0,82	0,20
MUFA, %	media	0,91	0,01	-0,10	0,15	0,12	-0,17	0,06	-0,11
	<i>P</i> (>0)	>0,99	0,55	0,14	0,86	0,81	0,19	0,63	0,35
C18:1, %	media	0,63	0,05	-0,08	0,11	0,13	-0,23	0,03	-0,11
	<i>P</i> (>0)	>0,99	0,67	0,20	0,79	0,84	0,11	0,57	0,34
PUFA, %	media	-0,02	0,03	-0,54	0,29	-0,07	0,52	-0,23	0,30
	<i>P</i> (>0)	0,45	0,59	<0,01	0,98	0,29	>0,99	0,10	0,88

¹Abreviaciones en el texto. ²Efecto de sustitución del alelo T respecto a C. ³*P*(>0): Probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero. En negrita, las probabilidades por encima de 0,95 y por debajo de 0,05.

ADDITIVE, DOMINANT AND EPISTATIC EFFECTS OF *SCD* AND *LEPR* GENES ON FAT CONTENT AND FATTY ACID COMPOSITION IN PIGS

ABSTRACT: A recent genome-wide association study in Duroc revealed two major loci affecting fat content in pig carcasses, which corresponded to the *SCD* and *LEPR* genes. While *LEPR* is associated with backfat thickness and intramuscular fat content, *SCD* affects their fatty acid composition. In this work, the additive, dominant and epistatic effects of one SNP at the promoter of the *SCD* gene and one SNP in exon 14 of the *LEPR* gene have been analyzed using data from 971 pigs of the same Duroc population. The *SCD* haplotype behaved additively, while the SNP in *LEPR* had complete dominance for some traits. Evidence of additive (*SCD*) per dominant (*LEPR*) epistatic effects were found on carcass weight and backfat thickness and on saturated and polyunsaturated fatty acids content. These two genes could be used as a model to better understand the epistatic effects of regulation of fat metabolism and deposition and to genetically improve meat and fat quality.

Keywords: fatty acids, Duroc, *SCD*, *LEPR*

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES *PPAR α* , *PPAR δ* Y *PPAR γ* EN CERDOS IBÉRICOS

Benítez, R., Muñoz, G., Fernández, A., Barragán, C., Núñez, Y., Rodríguez, M.C., Silió, L. y Óvilo, C.

Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid

E-mail: rmbenitez@inia.es

INTRODUCCIÓN

Los peroxisomas son orgánulos citoplasmáticos que contienen enzimas que intervienen en la respiración y el metabolismo lipídico. La proliferación de estos peroxisomas esta mediada por unos receptores específicos llamados PPARs pertenecientes a una superfamilia de receptores de hormonas nucleares. Esta familia está formada por tres genes (alfa, beta/delta y gamma) muy relacionados entre sí y que intervienen en la regulación de la homeostasis, la proliferación celular y la respuesta inmune (Bassaganya-Riera et al., 2005). Los tres están estrechamente relacionados con la regulación de la cantidad de grasa y con la obesidad por lo que son genes candidato biológicos para la deposición grasa en especies ganaderas. Además *PPAR α* (SSC5), *PPAR δ* (SSC7) y *PPAR γ* (SSC13) son candidatos posicionales para QTL detectados en diferentes poblaciones porcinas (Hu et al., 2005). En estudios previos se ha encontrado asociación de polimorfismos en estos genes con caracteres de interés. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados necesitan validar si las asociaciones observadas están presentes en otras poblaciones porcinas. Por otra parte, hasta el momento no se ha identificado ninguna variante funcional. En cerdo ibérico no hay estudios previos de caracterización ni de asociación.

Con estos antecedentes el objetivo de este estudio ha sido detectar polimorfismos en el cDNA de estos tres genes y realizar estudios de asociación de las variantes detectadas con caracteres fenotípicos y con la transcripción de genes involucrados en el metabolismo lipídico en cerdo ibérico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales, registros fenotípicos y genotipado: Se secuenció la región codificante completa de los genes *PPAR α* (1603 pb NM_001044526.1), *PPAR δ* (1647 pb NM_214152.1) y *PPAR γ* (2099 pb NM_214379.1) amplificada a partir de diferentes tejidos de ocho cerdos ibéricos de la estirpe Torbiscal. Para los estudios de asociación y expresión génica se utilizaron también animales Torbiscal de los que se dispone de genealogía completa y registros de rendimiento de la canal (porcentajes de los jamones, lomos y paletas), composición de lomo y jamón (grasa intramuscular, proteína y humedad) y perfil de ácidos grasos en grasa dorsal.

Para el genotipado de los polimorfismos se extrajo ADN genómico de muestras de sangre de 337 animales Torbiscal. El genotipado se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas (secuenciación Sanger, pirosecuenciación y análisis de fragmentos).

Análisis de expresión: Se analizó la expresión del gen *PPAR γ* y de seis genes relacionados con el metabolismo lipídico (*SCD*, *ELOVL6*, *FASN*, *ACACA*, *ME1* y *FABP5*) en 27 cerdos ibéricos de la estirpe Torbiscal, genotipados para la inserción encontrada en el gen *PPAR γ* . Se cuantificó la expresión de estos genes candidato mediante qPCR en biopsias de tejido adiposo del jamón obtenidas a 45 kg de peso vivo y muestras de tejido adiposo, músculo e hígado obtenidas al sacrificio a 110 kg.

Análisis estadístico: El efecto del SNP sobre el fenotipo se estimó utilizando los softwares REML/VCE6.0 y PEST mediante un modelo animal que incluyó como efecto fijo la paridera y como covariables el efecto aditivo y dominante del SNP y el peso de la canal. Para los análisis de asociación del SNP con los datos normalizados de expresión génica se realizaron pruebas ANOVA seguidas de un test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Polimorfismos detectados y frecuencias alélicas: Se identificaron tres SNPs en el gen *PPAR α* (c.80A>G, c.176C>T y c.530G>A), una inserción en el gen *PPAR γ* (c.1611_12insA) y ningún polimorfismo en el gen *PPAR δ* . Los tres SNPs del gen *PPAR α* son sinónimos, los dos primeros localizados en el exón 4 (cosegregando) y el último en el exón 6. La frecuencia

del haplotipo c.80G/c.176T fue 0,46 y la del alelo c.530A fue 0,24. Debido a la mayor informatividad del haplotipo c.80G/c.176T fue seleccionado para su genotipado y posterior análisis de asociación. La frecuencia del haplotipo c.80G/c.176T en la población fue 0,66. En cuanto a la inserción del gen *PPAR γ* , la frecuencia del alelo con inserción fue 0,84.

Análisis de asociación de los polimorfismos detectados con los caracteres de interés: Para el polimorfismo del gen *PPAR α* no se encontró ninguna asociación significativa con los caracteres de rendimiento y calidad de la carne. Sí se detectaron efectos aditivos de la inserción del gen *PPAR γ* (Tabla 1) sobre el porcentaje de humedad de jamón ($p < 0,013$) y su porcentaje de grasa intramuscular ($p < 0,023$). Además, se observó un efecto sugestivo de este polimorfismo sobre el porcentaje de jamón respecto al peso de la canal ($p < 0,067$). El alelo con la inserción, mayoritario en la población ibérica Torbiscal, estaría asociado con un mayor porcentaje de grasa, un mayor rendimiento y menor contenido de agua en el jamón.

Tabla 1. Resultados de asociación del polimorfismo c.1611_12insA del gen *PPAR γ* en Torbiscal

Caracteres	N	Media (SD)	Efectos <i>PPARγ</i>		
			a \pm SE	LR	P <i>PPARγ</i>
<i>Rendimiento canal</i>					
% lomo	329	2,97 (0,31)	0,01 \pm 0,03	0,20	0,654
% jamones	337	16,95 (0,82)	-0,13 \pm 0,07	3,34	0,067
% paletas	337	11,35 (0,60)	0,04 \pm 0,05	0,69	0,405
<i>Composición músculo l.dorsi (lomo)</i>					
Grasa intramuscular, %	256	7,77 (2,31)	-0,20 \pm 0,28	0,51	0,474
Proteína, %	256	20,75 (0,69)	-0,01 \pm 0,10	0,01	0,902
Humedad, %	256	70,97 (1,70)	0,17 \pm 0,21	0,65	0,420
<i>Composición músculo Gracillis (jamón)</i>					
Grasa intramuscular, %	194	5,87 (2,14)	-0,77 \pm 0,33	5,15	0,023
Proteína, %	194	22,21 (1,10)	0,24 \pm 0,18	1,68	0,194
Humedad, %	194	70,26 (2,07)	0,71 \pm 0,28	6,20	0,013
<i>Ácidos grasos</i>					
C16:0, %	336	21,34 (1,33)	-0,03 \pm 0,10	0,18	0,671
C18:0, %	336	10,74 (1,09)	0,01 \pm 0,08	0,01	0,898
C18:1, %	336	51,44 (2,21)	0,08 \pm 0,16	0,29	0,589
C18:2, %	336	10,48 (1,11)	0,07 \pm 0,07	1,04	0,307

Análisis de asociación del polimorfismo del gen *PPAR γ* con la expresión génica: El gen *PPAR γ* codifica un factor de transcripción que regula la expresión de enzimas lipogénicas y adipogénicas. La localización del polimorfismo encontrado en este gen en la región 3'UTR sugiere una posible implicación en la estabilidad del ARNm y/o en su regulación postranscripcional. Por ello se analizaron los efectos de la inserción detectada en este gen, sobre su propia expresión y sobre la expresión de varios de sus genes diana relacionados con el metabolismo lipídico, en distintos tejidos. En las muestras de músculo no se encontró ningún efecto del polimorfismo sobre la expresión de los genes candidato analizados. Por el contrario, en las muestras de tejido adiposo y en hígado, la inserción del gen *PPAR γ* estuvo significativamente asociada con la expresión de algunos de los genes estudiados. Los resultados se muestran en la Figura 1 e indican una influencia variable del genotipo sobre la expresión dependiendo del tejido y muestreo.

Los resultados indican el efecto positivo sobre la calidad y el rendimiento del jamón del alelo con inserción en el gen *PPAR γ* en la población estudiada y sugieren un mecanismo de acción del polimorfismo relacionado con su influencia sobre la expresión de genes de importancia decisiva en los fenómenos de adipogénesis y lipogénesis. El polimorfismo podría tener utilidad en selección en poblaciones cruzadas de cerdo ibérico en caso de confirmarse las asociaciones encontradas.

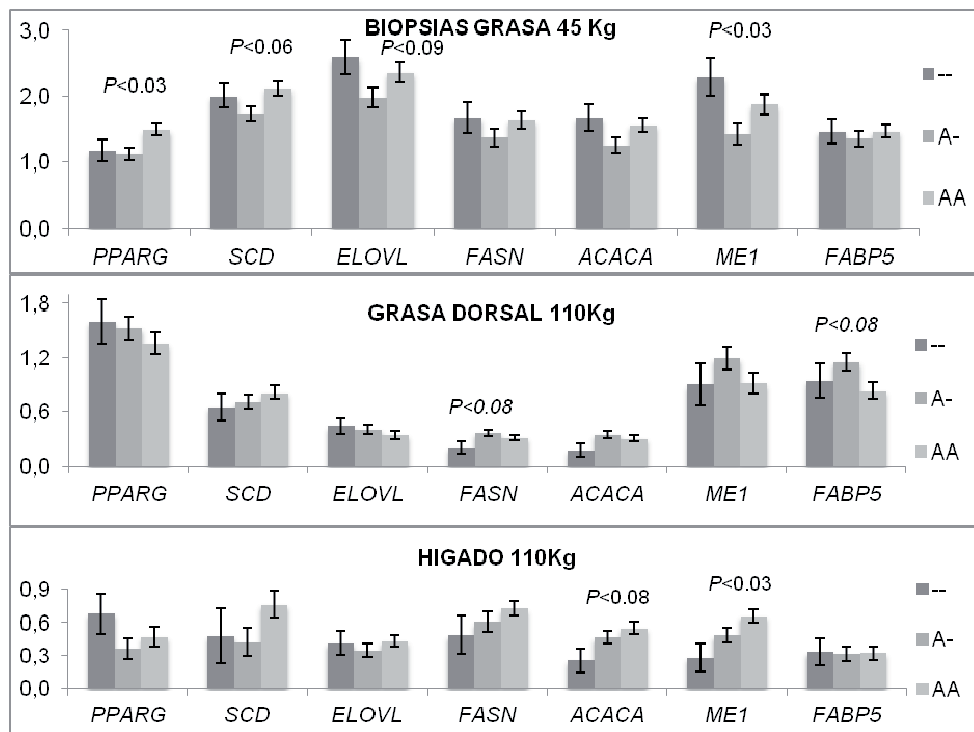


Figura 1. Asociación del polimorfismo del gen *PPAR γ* con la expresión génica de los genes candidato en tejidos adiposo y hepático

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bassaganya-Riera J, Guri A, King J, Hontecillas R. Food Science. 2005;1:179–187.
- Hu Z-L, Dracheva S, Jang W, Maglott D, Bastiaansen J, Rothschild M, Reecy J. Mammalian Genome 2005, 16(10):792.

Agradecimientos: Trabajo financiado por los proyectos RTA2007-00075-00-00, CAM-S2009/AGR-1704, y RZ2012-00006-00-00. Agradecemos la colaboración del personal del CIA 'Dehesón del Encinar' (Oropesa, Toledo).

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF POLYMORPHISMS IN *PPAR α* , *PPAR δ* AND *PPAR γ* GENES IN IBERIAN PIGS

ABSTRACT: PPARs are candidate genes for fat deposition. We studied the CDS of *PPAR α* , *PPAR δ* and *PPAR γ* genes in Iberian pigs and performed an association study of the polymorphisms found with productive traits. A novel insertion located in 3'UTR of *PPAR γ* gene was associated with the fat and water content of ham muscle and showed a suggestive association with ham yield. The functional involvement of this polymorphism was explored analyzing the genotype effects on the expression of *PPAR γ* and several downstream genes related to lipogenesis in different tissues. Results show some significant effects of the *PPAR γ* insertion on candidate gene expression in adipose and hepatic tissues. The allele with favourable effect on quality and yield traits shows a high frequency in the Torbiscal population studied and should be a potential marker for selection in crossbred populations.

Keywords: *PPAR* gene, pig, SNP, fat deposition, gene expression, intramuscular fat

ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR 1 DE MELANOCITOS (*MC1R*) Y EL LOCUS *E* PARA EL COLOR DEL PLUMAJE EN GALLINAS

Dávila, S. G., Gil, M. G., Resino-Talaván, P. y Campo, J. L.

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Departamento de Mejora Genética Animal, Ctra. de la Coruña, Km. 7,5, 28040 Madrid. sgdavila@inia.es

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales genes implicados en el color del plumaje en gallinas es el locus *E*. Este gen presenta 7 alelos: *E*E*, negro; *E*R*, abedul; *E*WH*, trigueño dominante; *E*N*, salvaje; *E*B*, pardo; *E*BC*, buttercup; y *E*Y*, trigueño recesivo, que afectan a la distribución en el plumaje de dos tipos de pigmentos (eumelaninas y feomelaninas). Este locus ha sido inicialmente mapeado en el cromosoma 1 por análisis de ligamiento (Smyth y Ponce de León, 1992; Carefoot, 1993). Estudios moleculares en varias especies de mamíferos han determinado que el locus *extension* (similar al locus *E* en aves) codifica para el gen del receptor 1 de melanocitos (Robbins et al., 1993; Kijas et al., 1998; Våge et al., 1999), habiéndose establecido asociaciones entre los diferentes alelos del locus *extension* y polimorfismos en el gen *MC1R*. Las mutaciones presentes en animales con alelos dominantes del locus *extension* resultan en un receptor activo y se han asociado con el color negro, mientras que las mutaciones que causan pérdida en la función del receptor son asociadas a los alelos más recesivos y con el fenotipo rojo-amarillo.

En gallinas hay estudios que han observado que el locus *E* puede corresponderse con el gen *MC1R* (Takeuchi et al., 1996ab; Okimoto et al., 1999; Ellet y Okimoto, 2000; Kerje et al., 2003; Ling et al., 2003), que ha sido mapeado en el cromosoma 11 por mapeo físico y genético (Sazanov et al., 1998; Kerje et al., 2003). Falta por aclarar las mutaciones que se asocian con cada alelo, habiéndose caracterizado diferentes polimorfismos en el gen *MC1R* que se han asociado con diferentes colores del plumaje (Tixier-Boichard et al., 2006; Yang et al., 2008; Guo et al., 2010).

El objetivo de este estudio ha sido analizar la asociación del gen *MC1R* con el color del plumaje, utilizando las diferentes razas españolas de gallinas mantenidas en el Programa de Conservación del I.N.I.A (Campo y Orozco, 1982), junto con una línea trigueña recesiva y una población de Leghorn Blanca.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 150 aves (5 machos y 5 hembras por población) seleccionadas al azar de 13 razas españolas de gallinas (Campo, 1998), una línea trigueña recesiva (Smyth, 1990), y una población Leghorn Blanca (Campo y Jurado, 1982). Las razas españolas utilizadas son portadoras de 6 diferentes alelos del locus *E*: *E*E* (Andaluza Azul, Andaluza Franciscana, Castellana Negra, Cara Blanca Española y Menorquina Negra), *E*R* (Indio de León y Pardo de León), *E*WH* (Castellana Codorniz, Prat Leonada y Vasca Barrada), *E*N* (Andaluza Perdiz), *E*B* (Villafranca Roja) y *E*BC* (Prat Blanca). La línea trigueña recesiva presenta el alelo *E*Y* y la población Leghorn Blanca es heterocigótica para el alelo *E*E*.

Se tomaron muestras de sangre mediante punción en la vena braquial para la extracción de ADN siguiendo un protocolo clásico. Se amplificó un fragmento que contenía 945 pb de la región codificante del gen *MC1R*, mediante PCR empleando un par de cebadores descritos por Dávila et al. (2014). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados con BigDye Terminator (Secugen S.L.).

Las frecuencias alélicas y fenotípicas fueron analizadas mediante chi-cuadrado con el programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), y los haplotipos fueron estimados mediante el programa PHASE 2.1 (Stephen y Scheet, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó una considerable diversidad genética para el gen *MC1R*, observándose un total de 12 SNPs en la región codificante del *MC1R*. Once de estos SNPs fueron significativos para los diferentes alelos del locus *E*, de los cuales nueve fueron no sinónimos (T212C, G274A, G376A, T398AC, G409A, A427G, C637T, A644C, and G646A) y dos fueron sinónimos (C69T y C834T). Nueve de estos SNPs presentaban una frecuencia de 0,5 o superior para alguno de los alelos del locus *E* (Tabla 1). Todas las poblaciones con fenotipo

negro y portadoras de los alelos E^*E o E^*R , excepto la raza Pardo de León, presentaban el alelo que codifica para el aminoácido *Lys* del SNP G274A. Esta mutación puede ser la responsable de la activación del receptor para producir eumelaninas. En concordancia con lo observado por Ellet y Okimoto (2000) se encontró que las aves E^*R que no presentaban variabilidad en el SNP G274A eran homocigóticas AA para el SNP T398AC, por lo que este polimorfismo puede ser también responsable de la activación constitutiva del receptor, estando 2 SNPs asociados a este fenotipo (G274A y T398AC). Las aves E^*N no presentaban ningún polimorfismo, en concordancia con lo observado por Takeuchi et al. (1996b), Ling et al. (2003) y Tixier-Boichard et al. (2006), y en contradicción a lo indicado por Ellet y Okimoto (2000) y Kerje et al. (2003) que observaron el T alelo del SNP C637T asociado a este fenotipo. Los animales E^*WH presentaban el SNP A427G, aunque este alelo G no estaba presente en las aves E^*Y como habían sugerido Ellet y Okimoto (2000), indicando que los alelos trigueños dominante y recesivo pueden diferir en su secuencia. En nuestro estudio las aves E^*Y presentaban el alelo T de SNP C637T, polimorfismo que no había sido descrito para este fenotipo, aunque en los estudios previos se utilizaron otras poblaciones diferentes, sugiriendo que el SNP C637T podría ser la causa de pérdida de función del receptor para producir eumelaninas. Para el alelo E^*B se observó fijación del alelo A para el SNP G274A en concordancia con lo indicado en estudios previos, aunque no se observó para este fenotipo el alelo C del SNP A644C indicado por Ellet y Okimoto (2000). El SNP A644C solo aparecía a baja frecuencia, mientras que en nuestras aves E^*B se observó el alelo A del SNP G409A, que no aparecía en ningún otro fenotipo. Esta mutación podría ser la responsable de atenuar la activación producida por G274A, dando lugar a un fenotipo pardo en lugar de negro. Por último las aves E^*BC presentaban 3 mutaciones (T398AC, A427G y C834T) no descritas para este fenotipo en trabajos previos.

Los resultados obtenidos para los diferentes fenotipos confirman una asociación entre el gen *MC1R* y el locus *E*, como se había observado para algunos alelos por diversos autores (Takeuchi et al., 1996ab; Okimoto et al., 1999; Ellet y Okimoto, 2000; Kerje et al., 2003; Ling et al., 2003). Esto sugiere que el color del plumaje está afectado por SNPs en el gen *MC1R*, en concordancia con lo indicado por Tixier-Boichard et al. (2006), Yang et al. (2008) y Guo et al. (2010).

La asociación observada en cada una de las razas está en concordancia con los resultados obtenidos por análisis genético mendeliano en trabajos previos de nuestro departamento (Campo y Orozco, 1986; Campo y Álvarez, 1988; Campo y Álvarez 1993), con la excepción de la Castellana Codorniz y el Indio de León.

Con siete de los SNPs que presentaban una frecuencia alélica de 0,5 o superior (C69T, T212C, G274A, T398AC, G409A, A427G y C637T) se construyeron 11 haplotipos, con respecto al de *Gallus gallus* (Ling et al., 2003). La frecuencia de estos haplotipos en los distintos alelos del locus *E* y en las distintas poblaciones indica que cada uno estaba predominantemente asociado con un alelo del locus *E*. El haplotipo asociado a la raza Villafranquina Roja (E^*B) fue exclusivo de esta raza y no había sido descrito previamente.

La cosegregación observada entre los alelos del locus *E* y los polimorfismos del gen *MC1R* sugiere que el locus *E* es equivalente al *MC1R*, aunque este gen no puede explicar toda la variación en la pigmentación y es necesario conocer los genotipos de este locus para la caracterización del color del plumaje en una raza determinada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campo, J. L., 1998. 6th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. pp. 155-158
- Campo, J. L., et al., 1982. Proc. 2nd World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. pp. 88-93
- Campo, J. L., et al., 1982. Proc. 2nd World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. pp. 869-874
- Campo, J. L., et al., 1986. Br. Poult. Sci. 27, 361-367
- Campo, J. L., et al., 1988. Poult. Sci. 67, 351-356
- Campo, J. L., et al., 1993. Poult. Sci. 72, 1218-1223
- Carefoot, W. C., 1993. Br. Poult. Sci. 34, 205-209
- Dávila, S. G., et al., 2014. Poult. Sci. 93, 1089-1096
- Ellet, A. E., et al., 2000. University Student Journal Inquiri, 1, 37-41
- Guo, X. L., et al., 2010. Br. Poult. Sci. 51, 734-739
- Kerje, S., et al., 2003. Anim. Genet. 34, 241-248
- Kijas, J. M. H., et al., 1998. Genetics, 150, 1177-1185
- Ling, M. K., et al., 2003. Eur. J. Biochem. 270, 1441-1449

Okimoto, R., et al., 1999. *Poult. Sci.* 78 (sup.1), 60. • Robbins, L. S., et al., 1993. *Cell* 72, 827-834. • Sazanov, A., et al., 1998. *Chromosome Res.* 6, 651-654. • Smyth, J. R., 1990. *Poultry Breeding and Genetics*. pp. 118-224 • Smyth, J. R., et al., 1992. *Poult. Sci.* 71, 208-210. • Stephen, M., et al., 2005. *Anim. J. Hum. Genet.* 76, 449-462. • Takeuchi, S., et al., 1996a. *Biochim. Biophys. Acta*, 1306, 122-126. • Takeuchi, S., et al., 1996b. *Biochim. Biophys. Acta*, 1308, 164-168. • Tixier-Boichard, J. L., et al., 2006. *Proc. 27th International Conference an Animal Genetic, ISAG*. pp. 342. • Våge, D. L., et al., 1999. *Mamm. Genome*, 10, 39-43. • Yang, A. Q., et al., 2008. *Res. J. Anim. Sci.* 2, 45-49.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el proyecto RTA2010-00138-00-00

Tabla 1. SNPs con frecuencia de 0,5 o superior para los alelos del locus *E*, en las 13 razas españolas de gallinas, la línea trigueña recesiva y la población Leghorn Blanca

<i>E</i> locus	Grupo ¹	C69T	T212C	G274A	G376A	T398AC	G409A	A427G	C637T	C834T
<i>E*E</i>		-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	CN	-	-	Lys	Ile	-	-	-	-	-
	MN	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	CB	-	-	Lys	Ile	-	-	-	-	Asn
	AF	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	AA	Asn	Thr	Lys	-	-	-	-	-	-
<i>E*R</i>	LGH	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	PA	-	-	Lys	-	Gln	-	-	-	-
<i>E*WH</i>	IN	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	CC	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-
<i>E*N</i>	AP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E*B</i>	VF	Asn	-	Lys	-	-	Thr	-	Cys	-
<i>E*BC</i>	PW	-	-	-	-	Pro	-	Ala	-	Asn
<i>E*Y</i>	T	-	-	-	-	-	-	-	Cys	-

¹ AA: Andaluza Azul, AF: Andaluza Franciscana, AP: Andaluza Perdiz, B: Vasca Barrada, CB: Cara Blanca Española, CC: Castellana Codorniz, CN: Castellana Negra, IN: Indio de León, MN: Menorquina Negra, LGH: Leghorn Blanca, P: Prat Leonada, PA: Pardo de León, PW: Prat Blanca, T: Trigueña recesiva, VF: Villafranca Roja

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN THE MELANOCORTIN 1 RECEPTOR GENE (*MC1R*) AND *E* LOCUS PLUMAGE COLOR PHENOTYPE IN CHICKENS

ABSTRACT: The purpose of this study was to investigate the effect of the *MC1R* gene on the plumage color in chickens. The gene was sequenced in 75 males and 75 females from 13 Spanish breeds, carrying 6 different alleles in the *E* locus (*E*E*, *E*R*, *E*WH*, *E*N*, *E*B*, *E*BC*), a recessive wheaten tester line (*E*Y*), and a White Leghorn population (heterozygous *E*E*). Eleven significant SNPs were detected. Nine of them were non-synonymous (T212C, G274A, G376A, T398AC, G409A, A427G, C637T, A644C, and G646A), and 2 were synonymous (C69T, and C834T). With respect to the significant SNPs, seven had an allelic frequency of 0.5 or greater for some of the alleles at the *E* locus. These results indicated a significant correlation between *MC1R* polymorphism and different alleles at the *E* locus. Eleven haplotypes were made with seven of the significant SNPs. The distribution of these haplotypes in the different alleles of the *E* locus showed that each haplotype was predominantly associated to one allele. The observed co-segregation of the *E* locus alleles and SNPs in *MC1R* suggests that the *E* locus is equivalent to *MC1R*.

Keywords: melanocortin 1 receptor, single nucleotide polymorphism, *E* locus, chicken

IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE CNVs EN PORCINO

Revilla^{1,2}, M., Puig-Oliveras, A., Crespo-Piazuelo, D., Fernández, A.I., Ballester, M. y Folch, J.M.

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Barcelona. ²Centre de Recerca en Agrigenòmica (Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB), Edifici CRAG, Campus UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona. manuel.revilla@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

Los CNVs (*Copy Number Variants*) son un tipo de polimorfismo genético estructural que consiste en la variación en el número de copias de un fragmento de DNA. Los CNVs pueden alterar la expresión génica y afectar a la variación de caracteres de importancia económica en animales domésticos.

En los últimos años, la secuenciación paralela masiva de millones de lecturas o *Next Generation Sequencing* (NGS) ha permitido el análisis global del genoma y se han desarrollado estrategias para la identificación de CNVs (Metzker, 2010). Entre las ventajas que el enfoque basado en NGS proporciona, se encuentran: una mayor resolución, una estimación más precisa del número de copias y una mayor capacidad para identificar nuevos CNVs (Alkan *et al.*, 2011).

Se han descrito varias estrategias para la detección de CNVs utilizando datos de NGS: *paired-end mapping* (PEM), *split read* (SR), *read depth* (RD), *assembly de novo* de un genoma (AS), así como una combinación de los enfoques anteriores (CB) (Zhao *et al.*, 2013). Debido a la alta cobertura generalmente proporcionada por los datos de NGS, los enfoques basados en RD se han convertido en un buen estimador para definir el número de copias. Ello es debido a que la cobertura de una región genómica está relacionada con el número de copias de la región (Teo *et al.*, 2012).

En un trabajo anterior, se identificaron 49 CNVs segregando en un cruce entre el cerdo Ibérico y Landrace (IBMAP) utilizando los genotipos del panel de 60 K SNPs (Ramayo-Caldas *et al.*, 2010). Fernández *et al.* (2014) identificaron 65 regiones de CNVs segregando en animales ibéricos utilizando datos de NGS y genotipos del panel de 60 K SNPs.

El objetivo del presente trabajo es identificar CNVs segregando en la población IBMAP a partir de datos de NGS del genoma de animales fundadores y estudiar el efecto de los CNVs en la determinación de caracteres de crecimiento y calidad de la carne en porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y secuenciación: El material animal utilizado procede del cruce IBMAP, generado por el cruce inicial de verracos Ibéricos Guadyerbas y cerdas Landrace (Pérez-Enciso *et al.*, 2000). Dos machos Ibéricos y cinco hembras Landrace se secuenciaron en un equipo HiSeq2000 (Illumina), con lecturas pareadas de 75 pb de longitud, generándose una media por animal de más de 307 millones de lecturas. Estas lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia porcino (*Sscrofa10.2*), con una cobertura media de 13,3 X.

Detección de CNVs: La detección de CNVs se realizó utilizando el programa *Control-FREEC* (Boeva *et al.*, 2012), basado en el enfoque RD. La detección de los CNVs se realizó analizando cada muestra contra el genoma de referencia en cerdos (*Sscrofa10.2*). Con el objetivo de refinar el análisis de los datos de secuenciación de alto rendimiento y evitar falsos positivos se utilizó el fichero de *mappability* creado con *gem-indexer* (<http://gemlibrary.sourceforge.net>). El valor de significación de cada CNV se calculó mediante el test no paramétrico *Wilcoxon Rank Sum Test*.

Solapamiento de CNVRs: La identificación de CNVRs (agrupación de CNVs próximos en el genoma con al menos un par de bases de solapamiento) se realizó con la herramienta *MultIntersect* de *BEDTools* (Aaron *et al.*, 2010).

Actualización de Assembly: Para comparar las regiones anotadas en el *Assembly 9* porcino (*Sscrofa 9*) por Ramayo-Caldas *et al.* (2010, 2012), se actualizaron las posiciones al *Assembly 10* (*Sscrofa10.2*) mediante la herramienta *Assembly Converter* de *Ensembl*.

Identificación de genes y función biológica: La anotación de los genes ubicados dentro de los CNVRs se realizó utilizando *BioMart* de *Ensembl* (ensembl.org/biomart) (Genes 78 Database, *Sscrofa10.2* Dataset). La anotación de la función biológica se realizó utilizando la base de datos de *Mouse Genome Informatics* (MGI, <http://www.informatics.jax.org/batch>).

Validación funcional de CNVRs: Se utilizaron muestras de DNA de 117 animales del BC1_LD (25% Ibérico, 75% Landrace) y 22 animales de distintas razas (6 Large White, 5 Landrace, 5 Duroc y 6 Ibéricos). Los *primers* se diseñaron con el software *Primer Express*[®] (Applied Biosystems), a partir de la secuencia porcina de referencia *Sscrofa 10.2*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado utilizando el kit *SYBR[®] Select Master Mix* (Life Technologies) en un ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Para cuantificar y normalizar los datos de expresión se empleó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron un total de 1.423 CNVs incluyendo duplicaciones y deleciones en los 7 animales utilizados en el estudio. El número de CNVs detectados en cada una de las muestras varió entre 264 (Ibérico) y 121 (Landrace), con una media de 203 CNVs por muestra (Tabla 1). Con el objetivo de identificar CNVRs que difirieran entre las dos razas, se agruparon los CNVs en función de su frecuencia en la población. Utilizando como criterio una frecuencia en la raza Ibérica de 1 y de 0-0,4 en la raza Landrace se detectaron un total de 178 CNVRs; mientras que con una frecuencia en la raza Ibérica de 0 y de 1-0,4 en la raza Landrace se detectaron 304 CNVRs.

Para seleccionar los CNVRs con posible efecto sobre el fenotipo de los animales estudiados se anotaron los genes presentes en estos CNVRs y su posible función, identificándose un total de 326 genes. Asimismo, se llevó a cabo una selección de CNVRs teniendo en cuenta trabajos anteriores de nuestro grupo y/o identificados por otros autores mediante búsqueda bibliográfica.

De los 178 CNVRs identificados en Ibérico, 12 CNVRs fueron identificados previamente en el trabajo de Ramayo-Caldas *et al.* (2010) y de los 304 CNVRs identificados en Landrace, 16 coincidían. El número de CNVRs que concuerdan con los descritos por Fernández *et al.* (2014) fue menor, 7 CNVRs en Ibérico y 4 en Landrace.

También, se identificaron un total de 7 CNVRs en Ibérico y 5 CNVRs en Landrace que solapaban con regiones genómicas asociadas con la composición de ácidos grasos en músculo (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012).

Por último, se compararon los genes localizados en los CNVRs con los genes diferencialmente expresados en el transcriptoma de hígado (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012b), grasa dorsal (Corominas *et al.*, 2013) y músculo (Puig-Oliveras *et al.* 2014) de animales con fenotipos extremos para la composición de ácidos grasos en músculo, identificándose un total de 7 genes en Ibérico y 4 genes en Landrace.

De los 178 CNVRs identificados en Ibérico, 38 CNVRs cumplían como mínimo con uno de los criterios anteriormente detallados, conteniendo un total de 21 genes. Mientras que para los 304 CNVRs identificados en Landrace, 45 CNVRs cumplían alguno de los criterios, identificándose 38 genes en estos CNVRs. Entre estos CNVRs se seleccionaron 5 para realizar su validación funcional mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Estos CNVRs se encuentran distribuidos en diferentes regiones del genoma porcino. Los CNVRs seleccionados contienen genes funcionales como son *CYP4X1*, *KIT*, *MOGAT2* y *PRKG1*, y un *novel protein* cuyo ortólogo humano es *CLCA4*. A excepción del CNVR, localizado en un intrón del gen *CLCA4*, los demás CNVRs incluyen exones codificantes. Los genes *CLCA4* y *KIT* fueron previamente identificados en el trabajo realizado por Ramayo-Caldas *et al.* (2010). El uso de datos de NGS ha permitido obtener una mayor resolución en los límites de los CNVs en comparación con el uso de datos genotípicos de SNPs, como es el caso del CNVR del gen *KIT* en el SSC8, pasando de un tamaño de 413 Kb (Ramayo-Caldas *et al.*, 2010) a 283 Kb.

La validación funcional realizada para el CNVR del gen *KIT* en razas puras nos ha permitido testar la validez de la técnica utilizada para determinar el número de copias, observándose que los individuos Ibéricos y Duroc presentaban sólo una copia en cada cromosoma, mientras que otras razas como Large White y Landrace presentan gran variación (Tabla 2). Se analizarán los demás CNVRs seleccionados así como la asociación de estos CNVRs con caracteres de crecimiento y composición de ácidos grasos. Los CNVRs detectados pueden ser útiles en futuras evaluaciones genómicas como marcador de caracteres de importancia económica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Aaron *et al.*, 2010. *Bioinformatics*. 26, 841-2. • Alkan *et al.*, 2011. *Nat. Rev. Genet.* 12, 363-76. • Boeva *et al.*, 2012. *Bioinformatics*. 28, 423-5. • Corominas *et al.*, 2013. *BMC Genomics*. 14, 843. • Fernández *et al.*, 2014. *Anim. Genet.* 45, 357-66. • Metzker, 2010. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31-46. • Pérez-Enciso *et al.*, 2000. *J. Anim. Sci.* 78, 2525-31. • Puig-Oliveras *et al.*, 2014. *PLoS One*. 9, e99720. • Ramayo-Caldas *et al.*, 2010. *BMC Genomics*. 11, 593. • Ramayo-Caldas *et al.*, 2012. *J. Anim. Sci.* 90, 2883-93. • Ramayo-Caldas *et al.*, 2012b. *BMC Genomics*. 13, 547. • Teo *et al.*, 2012. *Bioinformatics* 28, 2711-8. • Zhao *et al.*, 2013. *BMC Bioinformatics*. 11, S1.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-29821-C02 (Ministerio de Economía y Competitividad). M. Revilla ha sido financiado con una beca de Formació i Contractació de Personal Investigador Novell (FI-DGR) de la Generalitat de Catalunya (ECO/1639/2013). A. Puig-Oliveras ha sido financiada con una beca de la Universitat Autònoma de Barcelona (PIF, 458-01-1/2011). Agradecemos a J.L. Noguera (IRTA) su contribución en la obtención del material animal.

Tabla 1. Estadísticos de los CNVs para las 7 muestras analizadas (*Sscrofa10.2*)

Muestra	Raza	Número de CNVs			Longitud total media (kb)		
		Total	#duplicaciones	#delecciones	CNVs	Duplicaciones	Delecciones
I10	Ibérico	264	124	140	545,01	27,21	1003,64
I20	Ibérico	210	105	105	693,98	48,64	1339,32
IN9	Landrace	121	88	33	40,98	23,99	86,29
IN28	Landrace	225	131	94	25,02	23,28	27,44
IN39	Landrace	196	122	74	32,43	31,50	33,95
IN47	Landrace	222	132	90	22,00	17,88	28,05
IN51	Landrace	185	114	71	31,03	25,50	39,93
Media		203	117	87	198,64	28,29	365,52

Tabla 2. Cuantificación relativa por qPCR del gen *KIT* y su CNV estimado tomando como referencia el Ibérico (raza que menos variación presenta entre las distintas réplicas técnicas)

Gen	Nº de Animales				
	# 2 copias	# 3 copias	# 4 copias	# 5 copias	# 6 copias
Large White	-	-	1	2	3
Landrace*	-	1	2	1	1
Duroc	5	-	-	-	-
Ibérico*	6	-	-	-	-

*Ninguno de los individuos Ibérico o Landrace analizados pertenecía al proyecto IBBMAP.

CNVs IDENTIFICATION AND VALIDATION IN SWINE

ABSTRACT: The objective of this study was to identify copy number variants (CNVs) associated to growth traits and fatty acid composition in swine. Based on *Control-FREEC* software, we detected CNVs using the WGS of 7 individuals (2 Iberian boars and 5 Landrace sows). A total of 1,423 CNVs were identified with an average size of 198.64 kb in all individuals. Among them, 178 CNVRs were identified using a frequency of 1 for Iberian samples and 0-0.4 for Landrace. Using a frequency of 1-0.4 for Landrace and 0 for Iberian, 304 CNVRs were evidenced. 38 and 45 CNVRs respectively, overlapped with at least one of the selection criteria used. 59 genes located in these regions were identified after gene annotation. Interestingly, some of these genes (*CLCA4*, *CYP4X1*, *KIT*, *MOGAT2* and *PRKG1*) have been previously associated with lipid metabolism. This study provided new insights into genomic structural variations that may be affecting economically relevant traits in pigs.

Keywords: CNV, Swine, *KIT*.

ESTIMACIÓN DE VARIANZA EPIGENÉTICA TRANSGENERACIONAL

Varona¹, L., Munilla, S., Moursan, E. F., González-Rodríguez, A., Moreno, C. y Altarriba, J.

¹Unidad de Genética Cuantitativa y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. c/Miguel Servet 177. 50013. ZARAGOZA. lvarona@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La epigenética estudia las variaciones en la expresión génica que no son causadas por modificaciones de la secuencia de ADN (Eccleston *et al.*, 2007). La causas de esta variabilidad se atribuyen, entre otras, a metilación del ADN o modificaciones de la histonas (Jablonka y Raz, 2009). En ocasiones, estas modificaciones pueden afectar a las células germinales y transmitirse a la descendencia. (Youngson y Withelaw, 2008). Pese a todo, la magnitud de este fenómeno no se conoce (Heard y Martienssen, 2014).

Desde la perspectiva de la genética cuantitativa, la presencia de herencia epigenética transgeneracional implica una redefinición del parecido entre parientes. Tal *et al.* (2010) desarrollaron un modelo que permite calcular el parecido entre parientes en función de la heredabilidad epigenética (γ^2) y el coeficiente de borrado (ν), a partir del cual se estima el coeficiente de transmisión epigenética ($1-\nu$). El objetivo de este trabajo es presentar un análisis Bayesiano que permite estimar la varianza epigenética transgeneracional, el coeficiente de borrado, y el coeficiente de transmisión epigenética a partir de la información genealógica y fenotípica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se define un modelo mixto $\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \mathbf{Zw} + \mathbf{e}$, donde \mathbf{y} es el vector de datos fenotípicos, \mathbf{b} es el vector de efectos sistemáticos, \mathbf{u} es el vector de efectos genéticos aditivos, \mathbf{w} es el vector de efectos epigenéticos transmisibles y \mathbf{e} es el vector de residuos. Las asunciones para las distribuciones a priori de \mathbf{u} , \mathbf{w} y \mathbf{e} son las siguientes distribuciones normales multivariantes (MVN):

$$\mathbf{u} \sim MVN(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_u^2) \quad \mathbf{w} \sim MVN(\mathbf{0}, \mathbf{T}\sigma_w^2) \quad \mathbf{e} \sim MVN(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$$

donde σ_u^2 , σ_w^2 y σ_e^2 son las varianzas genética aditiva, epigenética y residual, respectivamente.

\mathbf{A} es la matriz de parentesco numerador y \mathbf{T} es la matriz de relaciones epigenéticas.

La estructura de la matriz \mathbf{T} se define a partir de la relación recursiva entre el efecto epigenético de un individuo (w_i) con respecto al efecto epigenético de su padre (w_{β_i}) y de su madre (w_{mi}): $w_i = \lambda w_{\beta_i} + \lambda w_{mi} + \varepsilon_i$ donde $\lambda = 0.5(1-\nu)$, ν es el coeficiente de borrado y $(1-\nu)$ el coeficiente de transmisión epigenética. Además, ε_i es el efecto epigenético residual del individuo i . En notación matricial:

$$\mathbf{w} = \mathbf{Pw} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

donde la matriz \mathbf{P} define la relación recursiva entre los efectos epigenéticos del padre y de la madre. Si se utiliza esta estructura es posible definir

$$\mathbf{T}^{-1} = [\mathbf{I} - \mathbf{P}]\mathbf{Q}_T^{-1}[\mathbf{I} - \mathbf{P}]$$

donde \mathbf{Q}_T :

$$\mathbf{Q}_T = \mathbf{V}(\boldsymbol{\varepsilon})\frac{1}{\sigma_w^2} = [\mathbf{I} - \mathbf{P}]\mathbf{T}[\mathbf{I} - \mathbf{P}]$$

Esta matriz tiene una estructura diagonal con valor uno para los individuos de la población base y $1-\lambda^2$ y $1-2\lambda^2$ para aquellos con uno o dos ancestros conocidos. Si se utiliza esta estructura, se puede definir el siguiente algoritmo para construir \mathbf{T}^{-1} mediante la lectura secuencial de la información genealógica:

- Si el padre y la madre son conocidos sumar 1 a la diagonal (i,i)

b) Si solo un progenitor (p) es conocido sumar $\frac{1}{(1-\lambda^2)}$ a la diagonal (i,i) , $\frac{-\lambda}{(1-\lambda^2)}$ a los elementos (i,p) , (p,i) y $\frac{\lambda^2}{(1-\lambda^2)}$ al elemento (p,p)

c) Si los dos ancestros (p and m) son conocidos sumar $\frac{1}{(1-2\lambda^2)}$ a la diagonal (i,i) , $\frac{-\lambda}{(1-2\lambda^2)}$ a los elementos (i,p) , (i,m) , (m,i) , (p,i) y $\frac{\lambda^2}{(1-2\lambda^2)}$ a los elementos (p,p) , (p,m) , (m,p) , (m,m)

Ejemplo: Población Vacuna Pirenaica.

Se ha utilizado, como ejemplo, la base de datos de la población vacuna Pirenaica, para el carácter peso al nacimiento. Se utilizaron, 78.209 registros de peso al nacimiento y una genealogía de 125.974 entradas.

El modelo de análisis fue:

$$y = \mathbf{Xb} + \mathbf{Z}_1\mathbf{u} + \mathbf{Z}_2\mathbf{m} + \mathbf{Z}_2\mathbf{p} + \mathbf{Z}_3\mathbf{h} + \mathbf{Z}_1\mathbf{w} + \mathbf{e}$$

donde \mathbf{b} incluyó sexo y edad de la madre, \mathbf{u} y \mathbf{m} son los vectores de los efectos directos y maternos, \mathbf{p} es el vector de efectos ambientales maternos, \mathbf{h} es el vector de efectos rebaño-año-estación, \mathbf{w} es el vector de efectos epigenéticos, y \mathbf{e} es el vector de residuos.

Se utilizaron dos modelos (I y II). El modelo I incluyó varianza epigenética transgeneracional y el Modelo II no, con un algoritmo de muestreo de Gibbs (Gelfand y Smith, 1990). Los modelos se compararon mediante la probabilidad pseudo-log-marginal de los datos (Gelfand, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta un ejemplo de genealogía con la matriz de relaciones epigenéticas (\mathbf{T}) y su inversa (\mathbf{T}^{-1}). El procedimiento de cálculo es similar al propuesto por Quaas (1976) para la matriz de parentesco numerador o por Quintanilla et al. (1999) para la matriz de relaciones ambientales maternas. El único limitante es que exige ser calculado en cada iteración del proceso de muestreo de Gibbs. Pese a todo, la implementación de este procedimiento es sencilla, ya que sólo involucra muestreo de distribuciones normales univariantes y chi-cuadrado invertidas.

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis. En ella se observa que el modelo seleccionado como más plausible no incluyó varianza epigenética.

El modelo utilizado asumió que el coeficiente de borrado es el mismo en machos y en hembras. El modelo propuesto se puede generalizar de manera sencilla a coeficientes de borrado diferentes entre sexos y ambientes, de manera que se pueden estudiar los efectos de estas situaciones en los coeficientes de transmisión epigenética.

Por otra parte, el modelo de transmisión epigenética se puede ver en un sentido más amplio, ya que permite modelizar mecanismos de herencia no genética, como la transmisión cultural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Eccleston, A., DeWitt, N., Gunter, C., Marte, B., Nath, D. 2007. *Nature* 447:395-400
- Gelfand, A. E. & Smith A. F. M. 1990. *Journal of American Statistical Association* 85:398-409
- Gelfand, A. E. 1996. En *Markov Chain Monte Carlo in Practice*, edited by W. R. Gilks, S. Richardson, and D. J. Spiegelhalter. Chapman & Hall, London.
- Heard, E & Martienssen, R. A. 2014. *Cell* 157:95-109
- Jablonska, E & Raz, G. 2009. *Q. Rev. Biol.* 84:131-176.
- Quintanilla, R., Varona, L., Pujol, M. R., Piedrafita, J. 1999. *J. Anim. Sci.* 77: 2904-2917.
- Tal, O., Kisdí, E. & Jablonka, E. 2010. *Genetics* 184:1037-1050.
- Youngson, N. A. & Withelaw, E. 2008. *Annu. Rev. Genomics Hum. Gen.* 9:233-257.

Agradecimientos: Los autores agradecen al proyecto de investigación AGL2010-15903 y a la Confederación Nacional de Asociaciones de Ganado Pirenaico (CONASPI).

Tabla 1. Media posterior y desviación típica posterior (entre paréntesis) para los modelo I y II

	Model I	Model II
h^2	0.377 (0.035)	0.412 (0.012)
m^2	0.149 (0.007)	0.148 (0.007)
γ^2	0.036 (0.034)	-
λ	0.398 (0.103)	-
ν	0.204 (0.207)	-
$1 - \nu$	0.796 (0.207)	-
LogCPO	-287542.3	-287475.1

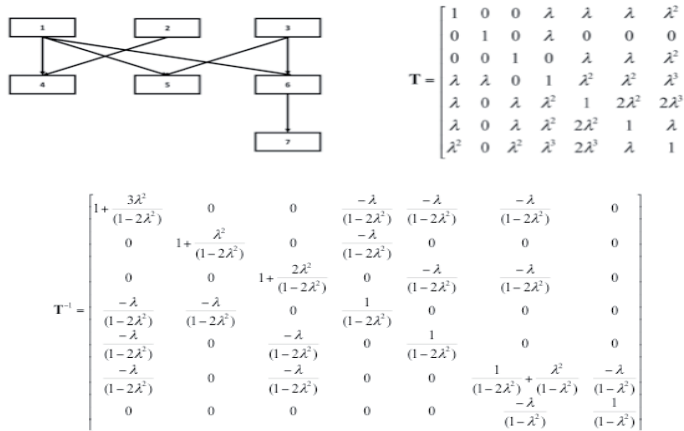


Figura 1. Ejemplo de genealogía, matriz de relaciones epigenéticas (T) y su inversa (T^{-1}).

EPIGENETIC VARIANCE COMPONENT ESTIMATION

ABSTRACT: Epigenetics has become one of the major areas of biological research. However, the degree of phenotypic variability that is explained by epigenetic processes still remains unclear. From a quantitative genetics perspective, the estimation of variance components is achieved by means of the information provided by the resemblance between relatives. In a previous study, this resemblance was described as a function of the epigenetic variance component and a reset coefficient that indicates the rate of dissipation of epigenetic marks across generations. Given these assumptions, we propose a Bayesian mixed model methodology that allows the estimation of epigenetic variance from a genealogical and phenotypic database. The methodology is based on the development of a T matrix of epigenetic relationships that depends on the reset coefficient. In addition, we present a simple procedure for the calculation of the inverse of this matrix (T^{-1}) and a Gibbs sampler algorithm that obtains posterior estimates of all the unknowns in the model. The new procedure was used with a beef cattle database. The posterior estimate of transgenerational epigenetic variability was very low and a model comparison test indicated that a model that did not included it was the most plausible.

Keywords: Epigenetics, Bayesian Analysis, Genetic Variance, Resemblance Between Relatives

EFFECTO DEL GEN BMP15 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DEL TIPO DE PARTO EN OVEJAS RASA ARAGONESA

Bodin., L.¹, Alabart, J.L.², Fathallah, S.¹, Jiménez-Hernando, M.A.³, Lahoz, B.², David, I.¹, Fantova, E.³ y Jurado, J.J.⁴

¹INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31326, Castanet-Tolosan, France. E-mail: Loys.Bodin@toulouse.inra.fr

²CITA de Aragón. Av. de Montañana 930. 50059 Zaragoza. España.

³UPRA-Grupo Pastores. Zaragoza. España.

⁴Departamento de Mejora Genética Animal. INIA. Ctra. La Coruña, km 7,5. 28040-Madrid. España.

INTRODUCCIÓN

La mutación *FecX^{ri}* del gen *BMP15*, descubierta en la raza Rasa Aragonesa (Alelo ROA®; Jurado y Calvo, 2007; Martínez-Royo et al., 2008), produce un incremento en la prolificidad de las ovejas heterocigotas (*FecX^{ri}/FecX^r* o R+) respecto a las no portadoras (*FecX^r/FecX^r* o ++) y esterilidad en las homocigotas (*FecX^{ri}/FecX^{ri}* o RR). Este aumento de prolificidad observado en las ovejas heterocigotas condujo a la cooperativa UPRA-Grupo Pastores a proponer el manejo de dicho gen en los rebaños de sus socios (seleccionadores o no) a través de un programa de difusión que evita la generación de hembras homocigotas (Folch et al., 2010). Desde la implementación de dicho programa de difusión, hay 11.036 hembras con genotipo conocido, obtenido bien por genotipado o por deducción a partir del genotipo de sus parientes. Si bien el efecto de la mutación *FecX^{ri}* sobre la tasa de ovulación y la prolificidad media es bien conocido (Lahoz et al., 2009), su efecto sobre la distribución del tipo de parto (simple, doble, triple...) no ha sido estudiado todavía por falta de datos suficientes. El objetivo de ese trabajo es conocer si, al igual que ocurre con la mutación Lacaune (*FecL*; Martin et al., 2014), la mutación *FecX^{ri}* produce también un aumento en la variabilidad del tipo de parto adicional al incremento funcional ligado al simple aumento de la prolificidad media.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos proceden de la base de datos utilizada para la evaluación genética de la población Rasa Aragonesa de UPRA-Grupo Pastores (Jurado, 2014) e incluyen: 1) los partos procedentes de monta natural de 269.503 ovejas, que se componen de 918.956 resultados con sus características recogidos durante 15 años en 309 rebaños; 2) el pedigrí tras 7 generaciones de dichas ovejas; 3) el genotipo de dichas ovejas y el de sus padres: ++; R+ o desconocido (desc.). La distribución por genotipos en función del tipo de parto observado se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución (números y %) del tipo de parto observado para cada genotipo.

Genotipo		TP=1	TP=2	TP=3	TP=4+	Total	Prolificidad observada
++	n	1.453	588	22	3	2.066	1,31
	%	70,3	28,5	1,1	0,15		
R+	n	12.501	14.200	2.526	210	29.437	1,68
	%	42,5	48,2	8,6	0,71		
desc.	n	608.755	268.218	10.035	445	887.453	1,33
	%	68,6	30,2	1,1	0,05		

El tipo de parto (TP) es una variable discreta que se analizó mediante el software ASReml, utilizando varios modelos umbral que asumen la existencia de una variable subyacente normal y unos umbrales que determinan las distintas categorías de parto. Todos los modelos incluyeron tres efectos aleatorios: la interacción rebaño-año-mes del parto (RAM: 15.706 niveles), un efecto genético aditivo animal (305.703 niveles), y un efecto ambiental permanente ligado a cada oveja (269.503 niveles). El primer modelo consideró únicamente como efectos fijos la edad (9 niveles) y el intervalo post-parto (5 niveles). El segundo modelo también incluyó el efecto fijo de genotipo (3 niveles). Finalmente, el modelo más completo

incluyó además la interacción entre el factor genotipo y los umbrales, resultando así un conjunto de umbrales para cada genotipo ($\{\tau^{R+}\}$, $\{\tau^{++}\}$ y $\{\tau^{desc.}\}$). Todos los modelos tuvieron la varianza residual sistemáticamente fijada a 1. La comparación de las varianzas en la escala observada se realizó a partir de las estimaciones de cada tipo de parto proporcionadas con el modelo de umbrales con interacción. La probabilidad de repuesta en la j -ésima categoría del genotipo i ($i=++, R+$ o desc.) fue estimada mediante una variable normal $N(\eta, 1)$ con $\hat{\Pi}_j^i(\eta) = \Phi(\hat{\tau}_j^i + \eta) - \Phi(\hat{\tau}_{j-1}^i + \eta)$ asumiendo $\tau_0^i = -\infty$ y $\tau_4^i = +\infty$. La media y la varianza sobre la escala observada para distintos valores de la media (η) de la variable subyacente se calcularon a su vez a partir de las fórmulas siguientes:

$$\mu_{obs}^i(\eta) = \sum_{j=1}^4 j \hat{\Pi}_j^i(\eta) \quad \text{y} \quad \sigma_{obs}^2(\eta) = \sum_{j=1}^4 j^2 \hat{\Pi}_j^i(\eta) - (\hat{\mu}_{obs}^i(\eta))^2$$

Estas estimaciones se llevaron a cabo para distintos valores de η cubriendo el rango de prolificidad observada en los tres genotipos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros genéticos de la variable subyacente para los tres modelos se presentan en la Tabla 2. Como era de esperar, la varianza genética es menor cuando el efecto del gen mayor ROA está incluido en los modelos. En esos casos, la varianza genética es puramente poligénica (debido a los genes de efecto pequeño), lo que permite estimar que el gen ROA representa alrededor del 20% de la variabilidad genética en esta población.

Tabla 2. Varianzas y parámetros genéticos del tipo de parto para los tres modelos con umbrales; errores estándar entre paréntesis.

	Modelo sin el factor genotipo	Modelo con el factor genotipo	Modelo con el factor genotipo
Número de umbrales	3	3	9
σ_{anim}^2	0,1202 (0,0038)	0,0967 (0,0039)	0,0994 (0,0039)
σ_{perm}^2	0,0228 (0,0037)	0,0394 (0,0039)	0,0367 (0,0039)
Heredabilidad : h^2	0,105 (0,001)	0,085 (0,003)	0,087 (0,003)
Repetibilidad: r	0,125 (0,003)	0,120 (0,001)	0,120 (0,001)

En todos los casos la heredabilidad es baja y consistente con los valores encontrados en la literatura, aunque ligeramente superior a las estimaciones obtenidas por Jurado et al. (2008) en esta raza. Sin embargo, estos autores analizaron los partos como un carácter continuo y consideraron datos procedentes de distintos modos de cubrición como un carácter único.

El modelo con un conjunto de umbrales por cada genotipo, es decir, con un factor de interacción entre umbrales y genotipos, no proporciona distintos parámetros genéticos en comparación a los otros modelos a pesar de que dicha interacción es altamente significativa ($P < 0,001$) y que el test de cociente de verosimilitudes indica que el modelo más completo es el preferible. Los umbrales estimados para los genotipos ++ y R+, así como la probabilidad de cada tipo de parto en función de distintos valores de la media (η) de la variable subyacente se muestran en la Tabla 3. El efecto medio del alelo $FecX^{R+}$, estimado como la diferencia entre las medias sobre la escala observada es de 0,314 corderos por oveja y parto (1,610-1,296), lo que se corresponde con las estimaciones previamente obtenidas por Jurado et al. (2008).

El modelo umbral clásico supone la existencia de una variable subyacente normal estándar $N(\mu=0, \sigma^2=1)$ y unos umbrales que varían conjuntamente según los factores de variación; o lo que es lo mismo, un conjunto de umbrales fijos y una variable subyacente normal cuya media varía. El desplazamiento de esa media según los factores de variación resulta en un cambio en los porcentajes de cada categoría sobre la escala observada. Por ejemplo, en el caso del genotipo ++, cuando η aumenta de 0 a 0,741, la media sobre la escala observada aumenta de 1,296 a 1,610, pero la variabilidad aumenta también (de 0,219 a 0,314). Este cambio de la varianza está matemáticamente ligado al cambio de la media. La existencia de una interacción entre el genotipo y los umbrales significa que el gen ROA induce un cambio

adicional de variabilidad además del meramente producido por el cambio de la media. Obsérvese (Tabla 3) que dentro del rango de variación de esta raza, los desplazamientos de la media subyacente proporcionan una varianza sobre la escala observada siempre ligeramente superior para los individuos R+ para un mismo valor de prolificidad media.

Tabla 3. Umbrales estimados para cada genotipo y distribución de los tipos de partos según distintos parámetros de la variable subyacente.

Umbrales	Genotipo ++				Genotipo R+			
T ₁	0,5517 (0,0347)				-0,1445 (0,0164)			
T ₂	2,5955 (0,0936)				1,6358 (0,0184)			
T ₃	3,4764 (0,2366)				2,9777 (0,3340)			
Parámetros de la variable subyacente								
η	0	0,271	0,502	0,741	-0,710	-0,447	-0,225	0
σ^2	1	1	1	1	1	1	1	1
Distribución de los tipos de partos sobre la escala observada								
μ_{obs}	1,296	1,400	1,500	1,610	1,296	1,400	1,500	1,610
σ^2_{obs}	0,219	0,263	0,292	0,314	0,228	0,278	0,315	0,346
%TP1	70,9	61,1	52,0	42,5	71,4	61,9	53,2	44,3
%TP2	28,6	37,9	46,2	54,3	27,6	36,2	43,7	50,7
%TP3	0,4	0,9	1,7	2,9	0,9	1,8	3,1	4,9
%TP4+	0,03	0,07	0,15	0,31	0,01	0,03	0,07	0,15

Sin embargo dicha diferencia es escasa. Por ejemplo, si la media fuera de 1,50 en los dos grupos, la varianza sobre la escala observada sería de 0,292 y 0,315 para los individuos ++ y R+, respectivamente, lo que se traduciría en unos porcentajes de corderos nacidos triples o más de 4% para los ++ y de 6% para los R+. Se trata pues de un efecto no relevante y muy inferior al aumento de variabilidad que proporciona el gen Lacaune (Martin et al., 2014). Esto puede ser debido a diferencias entre los mecanismos fisiológicos que se ven afectados por estas dos mutaciones, que se hallan en genes diferentes. En todo caso, de confirmarse este resultado, la diseminación de la mutación *FecX^r* en la población Rasa es más interesante que la *FecL* en la Lacaune, puesto que además de tener un efecto interesante sobre la media de la prolificidad, su efecto sobre su variabilidad es muy marginal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Folch J. *et al.* 2010. Pequeños Rumiantes 11(1): 17-20.
- Jurado J.J. & Calvo J.H. 2007. ITEA Vol. Extra 28(II):504-506.
- Jurado J.J. *et al.* 2008. ITEA 104(2):149-154.
- Jurado J.J., 2014. 21º Catálogo de reproductores de UPRA-Grupo Pastores.
- Lahoz B. *et al.* 2009. XIII Jornadas sobre Producción Animal AIDA pp. 678-680.
- Martin P. *et al.* 2014. Genet. Sel. Evol. 46, 48.
- Martínez-Royo A. *et al.* 2008. Animal Genetics 39, 294-297.

EFFECT OF THE BMP15 GENE ON LITTER SIZE VARIABILITY IN RASA ARAGONESA EWES

ABSTRACT: The effects of the BMP15 gene on litter size mean and variability were estimated in the Rasa Aragonesa population in which 31,503 lambing records from ewes of known genotype were analysed. Threshold models without the gene effect, with the gene effect and with the gene effect and the interaction between this effect and the set of thresholds were run using the ASReml software. The effect of the gene on the mean was 0.314 lambs per lambing and the interaction between genotype and the set of thresholds was highly significant. However, the change of resulting variance of litter size on the observed scale at a similar mean litter size was very low between genotypes. The effect of the BMP15 gene on litter size variability is much lower than that induced by the Lacaune gene, which reinforces the interest of this mutation in *BMP15* for increasing prolificacy in this breed.

Keywords: BMP-15, prolificacy, variability, Rasa aragonesa.

PARÁMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERES DE MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA EN MACHOS DE RAZA OVINA MANCHEGA

Jiménez-Rabadán^{a1}, P., Pérez-Guzmán^a, MD., Garde^b, J.J., García-Alvarez^b, O., Maroto-Morales^b, A., Soler^b, A.J., Fernández-Santos^b, MR. y Ramón^a, M.
^aCERSYRA; ^bSABIO-IREC

¹CERSYRA. Av. Del Vino 10. 13300. Valdepeñas (Ciudad Real), pijimenez@jccm.es

INTRODUCCIÓN

Dentro del contexto de los programas de mejora genética, la inseminación artificial (IA) es probablemente la técnica de reproducción asistida más importante como herramienta para la difusión de la mejora genética. El uso generalizado de la IA ha hecho que el rendimiento reproductivo de los animales adquiera mayor importancia, especialmente en el caso de los machos, pues un solo macho puede inseminar a un gran número de hembras. Los avances conseguidos en el campo de la valoración seminal, en especial los sistemas CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*), han permitido obtener gran cantidad de información sobre las características estructurales y funcionales del espermatozoide, y podrían resultar útiles para determinar la fertilidad de un macho (Casey *et al.*, 1997). El presente trabajo aborda la estima de parámetros genéticos para cinco caracteres de morfometría de la cabeza del espermatozoide en machos de raza ovina Manchega. Este trabajo ya ha sido llevado a cabo en otras especies (Lavara *et al.*, 2013) con resultados variables. Nuestro objetivo ha sido estimar los parámetros genéticos en esta raza y compararlos con los descritos en otras razas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 375 machos de raza ovina Manchega pertenecientes al Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA) de Valdepeñas. Estos machos participan en el programa de mejora genética de la raza ovina Manchega, y son usados para la difusión de dicha mejora por inseminación artificial (IA). La toma de muestras seminales para este trabajo se llevó a cabo entre los años 2008 a 2014, realizándose al menos 2 colectas por macho en los meses de septiembre a noviembre. Así, coincidiendo con la recogida (por vagina artificial) y preparación de las dosis seminales para IA, se tomó una muestra de cada eyaculado para su análisis y se evaluaron parámetros rutinarios como el volumen (ml), la concentración (SPZ/ml) y la motilidad subjetiva (%). A continuación, las muestras fueron procesadas para la evaluación de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides. Así, las muestras espermáticas fueron diluidas (1:300) en PBS con BSA (6 mg/mL). Se usaron alícuotas de 5 μ L de las muestras previamente diluidas para realizar frotis, los cuales se secaron al aire y se tiñeron siguiendo el protocolo de la tinción Hemacolor[®] descrita previamente para esta raza (Maroto-Morales *et al.*, 2010). Posteriormente, se realizó el montaje de los frotis colocando un cubre con dibutyl phthalate xylene (DPX) para ser analizados mediante el módulo de morfometría del software comercial Sperm-Class Analyser (SCA[®], Microptic, Barcelona, España). Se obtuvieron las dimensiones morfométricas de la cabeza del espermatozoide para la longitud (L; μ m), anchura (W; μ m), área (A; μ m²), perímetro (P; μ m), y para un parámetro derivado como es el p2a (*perimeter to area*: $P^2/4\pi A$) para un total de 150 espermatozoides de cada muestra. El parámetro p2a compara el perímetro de un objeto con su área (Sailer *et al.*, 1996), tomando un valor mínimo de 1 para un círculo y aumentando a medida que la forma se hace más elongada.

El modelo usado para la estima de componentes de varianza fue el siguiente:

$$y_{ijkmn} = \mu + \text{AÑO-MES}_i + \text{EDAD}_j + \text{CLASE}_k + a_m + p_n + e_{ijkmn}$$

donde, y_{ijkmn} es el carácter de morfometría espermática; AÑO-MES_i el efecto fijo año-mes de recogida (20 niveles); EDAD_j el efecto fijo edad del macho en el momento de la recogida (5 niveles); CLASE_k el efecto fijo clase del macho (3 niveles: machos en prueba, machos en prueba con pedigrí alto y machos probados mejorantes), a_m es el valor genético aditivo del animal i ; p_n el efecto de ambiente permanente del macho k ; y e_{ijkmn} el efecto residual. El factor CLASE_k fue incluido para tener en cuenta las diferencias en el régimen de salto (periodicidad) entre animales. Los análisis se realizaron con el paquete MCMCglmm (Jarrod, 2010) de R (R Core Team, 2014). Se corrieron un total de 50.000 iteraciones por análisis,

descartándose las 10.000 primeras (burn-in) en los análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra un resumen de las características de morfometría de la cabeza de los espermatozoides para los 375 machos usados en este estudio. Los valores medios obtenidos se encuentran dentro del rango descrito para la raza (Maroto-Morales et al., 2010).

Tabla 1. Resumen de las características de longitud (L), anchura (W), área (A), perímetro (P) y p2a de la cabeza de los espermatozoides para los 375 machos usados en este estudio

	L (μm)	W (μm)	A (μm^2)	P (μm)	p2a
Media	8,82	4,81	34,97	25,24	1,35
SD	0,24	0,17	1,89	1,67	0,28
Rango	8,00 – 9,48	4,32 – 5,33	29,48 – 40,24	22,44 – 30,12	1,03 – 1,89

La Tabla 2 muestra las estimas de heredabilidad (h^2) y repetibilidad ($p^2 = (\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2) / \sigma_p^2$) para los caracteres de morfometría de la cabeza de los espermatozoides. Las estimas de heredabilidad obtenidas fueron de moderadas-altas, con valores de 0,23, 0,29, 0,25, 0,22 y 0,26 para los caracteres longitud, anchura, área, perímetro y p2a, respectivamente. Estas estimas se encuentran dentro del rango de valores descrito por otros autores en conejos (Lavara et al., 2013). El carácter anchura de la cabeza (W) ha resultado ser el más heredable, coincidiendo con los resultados obtenidos en el trabajo de Lavara y colaboradores. Por contra, en machos de raza ovina la estima obtenida para el carácter p2a ha sido de 0,25, un valor muy superior a la estima de 0,07 observada en conejos (medida como Fun4, la inversa del p2a). Otros estudios han mostrado una alta correlación de este parámetro con la motilidad espermática y la fertilidad (Ramón et al., 2014). Estos autores observaron como aquellos machos con un mayor porcentaje de espermatozoides con cabezas más elongadas (mayores valores de p2a) eran más fértiles. Basándonos en los resultados obtenidos en ambos estudios, resultará interesante evaluar el interés del carácter p2a como criterio de selección para obtener machos más fértiles.

Tabla 2. Estimas de heredabilidad (h^2) y repetibilidad (p^2) para las características de longitud (L), anchura (W), área (A), perímetro (P) y p2a de la cabeza de los espermatozoides en machos de raza ovina Manchega.

	L (μm)	W (μm)	A (μm^2)	P (μm)	p2a
h^2	0,23 \pm 0,11	0,29 \pm 0,10	0,24 \pm 0,09	0,22 \pm 0,07	0,26 \pm 0,07
p^2	0,56 \pm 0,08	0,51 \pm 0,09	0,45 \pm 0,09	0,44 \pm 0,08	0,51 \pm 0,06

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Casey et al., 1997. *Theriogenology* 47, 575-582. • Jarrod, 2010. *J Statistical Software* 33, 1-22. • Lavara et al., 2013. *Theriogenology* 80, 313-8. • Maroto-Morales et al., 2010. *Theriogenology* 73, 437-448. • R Core Team 2014. R Foundation for Statistical Computing. • Ramón et al., 2014. *Biol. Rep.* 89, 110-117. • Sailer et al., 1996. *Cytometry* 24, 167-173.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2012-00017-00. MR está financiado por una ayuda del programa DOC-INIA. Agradecemos a la asociación AGRAMA la cesión de datos de genealogía.

GENETIC PARAMETERS FOR SPERM MORPHOMETRIC TRAITS IN RAMS OF MANCHEGO SHEEP

ABSTRACT: Artificial insemination (AI) is an important tool within breeding programs allowing the dissemination of genetic gain. Given the widespread use of AI, reproductive efficiency has become an important trait since a single male is able to inseminate several females. Therefore, an improvement of reproductive success could result in a higher genetic progress. Sperm morphology has been identified as a characteristic that can be useful in the prediction of fertilizing capacity. Therefore, the present study aimed to estimate genetic parameters for morphometric head dimensions such as area (A , μm^2), perimeter (P ; μm), length (L ; μm), width (W ; μm) and $p2a$ (*perimeter to area*: $P^2/4\pi A$). A total of 375 Manchego rams were used for this study and at least 150 spermatozoa per ejaculate were evaluated by CASA analysis. Estimates of heritability (h^2) were medium to high with values of 0.23, 0.29, 0.25, 0.22 y 0.26 for length, width, area, perimeter and $p2a$, respectively. The latter has been reported to be higher correlated with sperm velocity and male fertility, and therefore, it would be of interest the study of this trait as a selection criterion to improve male fertility.

Keywords: sperm morphometry, genetic parameters, rams

PARÁMETROS GENÉTICOS Y EFECTOS DE CRUZAMIENTO EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN CERDO IBÉRICO

Ibáñez-Escriche, N¹., Magallón, E². y Noguera, J.L¹.

¹Genètica i Milllora Animal. IRTA. Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida.

² INGA FOOD S.A. C./ Baleares SN, Casetas, 50620 Zaragoza, Spain

Noelia.ibanez@irta.es

INTRODUCCIÓN

El valor añadido que incorporan los productos de alta calidad producidos (ej. jamones) es un factor determinante en la rentabilidad del sector porcino ibérico. La naturaleza adipogénica del cerdo ibérico es una de las características que definen la calidad de ambos, la carne y sus productos curados (López-Bote, 1998). La estructura genética, junto a la alimentación, es uno de los factores que más afectan a la alta deposición de grasa en el músculo (Ruiz y López Bote 2002). De hecho, en relación a la calidad de la carne, se ha encontrado una gran variabilidad entre las estirpes que componen la población de cerdo ibérico (Juárez et al., 2009). No obstante, a pesar del claro determinismo genético de los componentes de la calidad de carne en cerdo ibérico, apenas se ha seleccionado genéticamente por este carácter. De hecho, los esquemas organizados de selección genética en cerdo ibérico son escasos y relativamente recientes (Silió, 2000). Por tanto, el objetivo principal de este estudio es estimar los efectos de cruzamiento y parámetros genéticos de la composición de la grasa en tres estirpes de cerdo ibérico para poder definir futuras estrategias de selección y cruzamiento en un programa de mejora genética de ibérico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental. La base de datos usada en este estudio procede de un experimento dialéctico de la empresa Inga Food S.A. compuesto por tres estirpes de ibérico (Retinto: RR, Torbiscal: TT y Entrepelado: EE) y sus cruces recíprocos. Durante el experimento, los animales fueron criados en condiciones intensivas comerciales. Los animales fueron engordados “*ad libitum*” y sacrificados en un matadero comercial con una edad media de 340 días (~160 kg). Los caracteres analizados están compuestos por el espesor de tocino dorsal medido en la cuarta costilla (ETD4), el % de grasa intramuscular (GIM) tomada en el *Longissimus dorsi* (LD), el % de ácidos grasos Saturados (SFA), Monoinsaturados (MUFA) y Poliinsaturados (PUFA) de la GIM (LD) y de la grasa Subcutánea (SC) tomado de la rabadilla del cerdo. El número de datos, distribución por cruce y los resúmenes estadísticos para todos los caracteres analizados se presentan en la Tabla 1 y Tabla 2.

Análisis estadístico. El siguiente modelo animal Bayesiano bivariante fue utilizado para analizar la GIM y el ETD4 y la composición de AG en el LD y en el SC, respectivamente:

$$(y | \mathbf{b}, \mathbf{a}, \mathbf{c}, R_0) \sim N(\mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{W}\mathbf{c}, R_0 \otimes \mathbf{I}_n),$$

Donde \mathbf{b} representa la covariable peso y los efectos sistemáticos de lote (12), sexo (macho o hembra), y de acuerdo al modelo de Dickerson (1969), el efecto directo de línea, materno y de heterosis (3 niveles cada uno), \mathbf{a} es el vector de efectos genéticos aditivos (896 niveles), \mathbf{c} es el vector de efectos de camada (157 niveles), \mathbf{X} , \mathbf{Z} , \mathbf{W} son matrices de incidencia conocida y R_0 es la covarianza 2x2 de la matriz residual. Como distribuciones a priori, se asignaron normales bivariantes para los efectos genéticos aditivos $\mathbf{a} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{G}_0 \otimes \mathbf{A})$ y los efectos de camada $\mathbf{c} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{C}_0 \otimes \mathbf{I})$ y distribuciones uniformes para las matrices \mathbf{G}_0 , \mathbf{C}_0 y R_0 . Los análisis se realizaron aplicando el algoritmo de *Gibbs*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Componentes de varianza. La media posterior de la heredabilidad (Tabla 3) fue intermedia (~0,35) excepto para los PUFA del SC que fue sensiblemente menor (0,19). Estas heredabilidades estarían en el rango de las obtenidas en ibérico para %GIM (Fernández et al., 2003) y menores a las obtenidas en composición de AG en otros estudios en Duroc (Ros-Freixedes et al., 2014). La media posterior de las correlaciones genéticas entre % AG del SC y de la GIM (LD) obtenidas fueron altas y positivas, excepto para los PUFA que fue negativa, aunque la desviación estándar fue elevada. Las correlaciones genéticas obtenidas fueron similares a las publicadas en otros estudios (Ros-Freixedes et al., 2014.), excepto

para los PUFA. Las media posterior del ratio entre la varianza de camada y la varianza fenotípica (no mostrada) fue importante para los AG y GIM del LD (0,32-0,22), mientras que para los AG del SC y la ETD4 estos fueron irrelevantes (0,04 - 0,11).

Efectos de cruzamiento. Los parámetros de cruzamiento (Tabla 4) revelan importantes diferencias entre líneas y efectos de heterosis. En particular, la línea RR muestra relevantes efectos directos de línea en los MUFA de la GIM (LD), en el ratio MUFA/SFA y en el ETD4. En contraposición, los AG del SC y la GIM del LD efectos relevantes de heterosis, especialmente para el cruce ExR en GIM (LD) y el cruce ExT en los MUFA del SC.

Conclusión. Este estudio muestra un importante determinismo genético para los AG lo que indicaría la posibilidad de seleccionar por estos caracteres. Sin embargo, la correlación genética obtenida para los PUFA sugiere una regulación genética diferente en los PUFA de la GIM (LD) que del SC. Adicionalmente, los AG de la GIM (LD) también mostraron un importante efecto de camada por lo que es fundamental su incorporación en los modelos de evaluación genética de este carácter. Por otra parte, los relevantes efectos directos de línea y de heterosis encontrados muestran la importancia de una adecuada selección de las estirpes y su cruzamiento en un esquema de mejora de cerdo ibérico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dickerson, G.E. 1969. Anim. Breed. Abstract. 37:191-202
- Fernández A. et al. 2003. Meat Sci. 64: 405-402
- Juárez M., et al. 2009. Meat Sci. 81: 573-579
- López-Bote, C. J. 1998. Meat Sci. 49: 17-27
- Ruiz J., et al. 2002. (Toldrá F, eds.). Research Signpost, Trivandrum (India), pp: 255-271.
- Ros-Freixedes, R., et al. 2014. J. Anim. Sci. 90 :5417-5425
- Silió 2000 (Eds.) ICAR, Rome, 511-519.

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA 2012-0054-C02-01) y el CDTI (IDI-20100447). Los autores expresan su agradecimiento a la empresa Inga Food S. A. y a su personal participante en el experimento: M. Ramos, M.J. García, L. Muñoz y P. Díaz y a los Doctores. J.F. Tejada y E. González de la Universidad de Extremadura.

Tabla 1. Distribución de muestras por cruce en el experimento dialélico.

Estirpe	Torbiscal (T)	Entrepelado (E)	Retinto (R)
Torbiscal (T)	TT(101)	TE (25)	TR (48)
Entrepelado (E)	ET(17)	EE (25)	ER(14)
Retinto (R)	RT(161)	RE (19)	RR (60)

Tabla 2. Media y desviación estándar (de) de los caracteres analizados.

Caracteres	%Ácidos Grasos						%SC	
	¹ ETD4	² GIM (LD)	³ SFA	⁴ MUFA	⁵ PUFA	SFA	MUFA	PUFA
Media	8,97	8,19	39,84	53,15	6,97	36,97	51,52	11,51
de	1,25	2,6	2,32	2,28	1,10	2,63	2,14	1,74

¹ETD4: Espesor tocino dorsal en la cuarta costilla; ²GIM (LD): Porcentaje de grasa intramuscular en el *Longissimus dorsi*; ³SFA: Ácidos grasos saturados; ⁴MUFA: Ácidos grasos Monoinsaturados; ⁵PUFA: Ácidos grasos Poliinsaturados; ⁶SC: Grasa del subcutáneo.

Tabla 3. Media y desviación estándar (de) de la heredabilidad (h^2) y correlación genética (r_g) para el % de ácidos grasos de la grasa intramuscular (GIM) en *Longissimus dorsi* (LD) y el Subcutáneo (SC), el % de GIM en LD y el espesor de tocino dorsal (ETD4).

h^2	SFA	MUFA	PUFA	MUFA/SFA	PUFA/SFA	GIM	ETD4
-------	-----	------	------	----------	----------	-----	------

LD	0,36 (0,16)	0,32 (0,15)	0,33 (0,19)	0,32 (0,17)	0,31 (0,17)	0,26 (0,15)
SC	0,38 (0,13)	0,43 (0,14)	0,19 (0,12)	0,43 (0,14)	0,32 (0,13)	0,21 (0,10)
r_g						GIM-ETD4
LD,SC	0,58 (0,27)	0,68 (0,25)	-0,41 (0,52)	0,65 (0,26)	-0,19 (0,45)	0,31 (0,47)

Tabla 4. Medias de la distribución posterior de las diferencias del efecto directo (L) y maternal (M) de las líneas Torbiscal (TT) y Retinto (RR) respecto a la línea Entrepelado (E) y los efectos de heterosis (H) de los cruces para los caracteres analizados.

Caracteres	L _{TT}	L _{RR}	M _{TT}	M _{RR}	H _{ET}	H _{ER}	H _{TR}
¹ SFA	-0,84	-1,96**	0,43	-0,18	-0,25	0,59	-0,06
LD ² MUFA	0,52	1,62*	-0,11	0,29	-0,19	-0,64	0,10
³ PUFA	0,21	0,46	-0,10	-0,05	0,48*	0,05	-0,03
MUFA/SFA	0,06	0,11**	-0,01	0,026	0,00	-0,04	0,00
PUFA/SFA	0,009	0,021*	-0,005	0,000	0,013*	-0,002	-0,001
SC SFA	-0,95	0,55	0,44	-0,57	0,91	0,72	-0,46*
MUFA	0,80	-0,40	-0,10	0,58*	-1,15**	-0,76	0,63*
PUFA	0,23	-0,04	-0,39	-0,04	0,25	0,01	-0,15
MUFA/SFA	0,06	-0,04	-0,01	0,04*	-0,07*	-0,05*	0,03
PUFA/SFA	0,015	-0,005	0,014*	0,004	-0,003	-0,008	-0,001
⁴ GIM(LD)	-0,69	-0,40	-0,32	0,34	0,04	1,36**	-0,77*
⁵ ETD4	0,47	0,98**	-0,18	-0,48*	0,10	0,21	0,07

¹SFA: Ácidos grasos saturados; ²MUFA: Ácidos grasos Monoinsaturados; ³PUFA: Ácidos grasos Poliinsaturados; ⁴GIM (LD): Porcentaje de grasa intramuscular en el *Longissimus dorsi*; ⁵ETD4: Espesor tocino dorsal en la cuarta costilla; *Probabilidad del al menos el 90% de que el valor posterior sea superior a cero; ** Probabilidad de al menos el 75% de que el valor sea mayor a un valor relevante (1/3 sd del caracter).

GENETIC PARAMETERS AND CROSSBREEDING EFFECTS OF THE FATTY ACIDS COMPOSITION ON IBERIAN PIG

ABSTRACT: Iberian pig is characterized by their adipogenic nature that defines the high quality of both, meat and their cured product. Genetics in one of the main factors on the fat muscle deposition in Iberian pig. In fact, there is a higher variability between Iberian pig strains. Nevertheless, Iberian pig breeding schemes are scarce and the implementation of meat quality as selection objective is practically absent. The aim of this study was to estimate the genetics parameters and crossbreeding effects of the fatty acid composition for intramuscular fat on *Longissimus dorsi* and subcutaneous fat in three Iberian pigs. The data base used (470 animals) belongs from a diallelic experiment with Retinto, Torbiscal and Entrepelado strains growing and slaughtering under commercial environment. Results showed an important genetic determinism for intramuscular fat and the fatty acid composition. Additionally, intramuscular fat and their fatty acid composition are also regulated by the common litter effect. Regarding crossbreeding effects, relevant differences were exhibit between direct line effects for fatty acids composition on the *Longissimus dorsi* and relevant heterosis effects for the Intramuscular fat on *Longissimus dorsi* which would indicate the importance of a proper selection of the strains in a breeding Iberian pig scheme.

Keywords: crossbreeding effects, Iberian pigs, fatty acids, genetic parametres.

COMPONENTES DE LA EFICIENCIA ALIMENTARIA EN CERDOS DUROC Y SU RELACIÓN GENÉTICA CON LA CALIDAD DE LA CARNE

Sánchez, J.P.¹, Reixach, J.⁴, Quintanilla, R.¹, Estany, J.², Ibáñez-Escriche, N.¹, Rothschild, M.³ y Piles, M.¹

¹Genética i Millora, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona, Spain.

²Departament de Producció Animal, ETSEA, Universitat de Lleida, 191 Av. Alcalde Rovira Roure, 25198 Lleida, Spain. ³Department of Animal Science, Iowa State University, 50011 Ames, IA, US. ⁴Selección Batallé, S.A., Riudarenes, 17421 Girona, Spain.

juanpablo.sanchez@irta.es

INTRODUCCIÓN

Los costes de alimentación durante la fase de cebo supusieron en España en 2013 un 68% del total de los costes variables (Observatori del Porcí, 2013). Por lo tanto mínimas mejoras en la eficiencia en el uso del pienso durante esta fase van a tener una repercusión importante en los gastos de explotación. La mejora del crecimiento magro es una forma indirecta de actuar sobre la eficiencia alimentaria; sin embargo, sería más eficaz considerar medidas directas de eficiencia que contemplen el consumo individual. Obviamente esto queda condicionado por la disponibilidad de medidas de consumo individual, lo que ha conducido, en los últimos años, al desarrollo de equipos electrónicos que permiten obtener este dato. Por otro lado, la calidad de la carne es un factor muy relevante en ciertos mercados, de ahí que disponer de líneas especializadas en estas características es de gran interés. Tal es el caso de la línea objeto de estudio, en la que se ha llevado a cabo un experimento exitoso de selección con restricción para reducir el espesor de grasa dorsal (mejorar crecimiento magro) evitando la reducción del contenido de grasa intramuscular (Ros-Freixedes et al., 2013). Existen pocos trabajos que ofrezcan estimas de la correlación genética entre eficiencia alimentaria y caracteres de calidad de carne, y la mayoría de ellos se refieren a poblaciones especializadas en crecimiento magro o eficiencia alimentaria. En el presente trabajo presentamos estimas de la correlación genética de una medida de consumo de pienso residual con el contenido de grasa intramuscular y el pH a las 24h post-mortem, en una población Duroc caracterizada por tener un alto contenido en grasa intramuscular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron datos de consumo de 1076 cerdos, recogidos entre las 15 y 26 semanas de edad en el Centro de Control Porcino de IRTA-Monells. En estos animales se registró el peso y el espesor de tocino dorsal un promedio de 6 veces, lo que permite calcular las ganancias medias diarias de peso (GMD (Kg/d)) y de espesor de tocino dorsal (GMETD (mm/d)) semanalmente. El consumo diario se registró utilizando el sistema IVOG (Insentec, Marknesse, The Netherland), lo que permitió el cálculo del consumo medio diario (CMD(Kg/d)) semanalmente. Los datos proceden de 4 experimentos desarrollados entre 2004 y 2013. En dos de ellos, se registró además el contenido de grasa intramuscular (GIM) del *Gluteus Medius* (NIT, Infratec 1625, Tecator Hoganas, Sweden) y el pH a las 24 (pH24) horas post-mortem en el *Longissimus dorsi* (pHmetro portátil SCHARLAU; HI-9025 Microcomputer). La población de la que procedían los animales se somete desde 1991 a un proceso de selección en el que los caracteres con más relevancia son el peso (P180) y el espesor de tocino dorsal (TD180) a los 180 días de vida, además la GIM también recibe cierta consideración. La Tabla 1 muestra las estadísticas descriptivas de los caracteres considerados.

La eficiencia alimentaria se definió considerando el consumo de pienso residual, para lo que el CMD se ajustó por una regresión múltiple fija sobre el peso metabólico (PM), la GMD y la GMETD, además de por una regresión aleatoria sobre PM y GMD que incluía los efectos genético aditivo y permanente. En el modelo también se incluyeron como factores sistemáticos el lote y el efecto lineal de la edad, así como el efecto aleatorio del corral. Este modelo de regresión aleatoria es similar a otro modelo jerárquico propuesto por Piles et al. (2007) para estudiar la eficiencia de uso del pienso para distintas funciones. El pH24 y la GIM se ajustaron considerando un modelo animal, incluyendo el efecto aleatorio del corral, el efecto sistemático del lote, y la covariable peso al sacrificio. Los caracteres criterio de selección (P180 y TD180) igualmente se ajustaron con un modelo animal con efectos de

camada de origen, corrigiendo por la edad, e incluyendo los efectos de lote y sexo. Por lo tanto, el análisis final implicó un modelo de 5 caracteres, uno de ellos de regresión aleatoria, en el que los parámetros se estimaron utilizando un procedimiento MCMC Bayesiano, para el que se asumieron distribuciones a priori estándar. Para la caracterización de las distribuciones marginales posteriores se obtuvieron un total de 475.000 muestras de las que se descartaron las primeras 150.000, salvando 1 de cada 50.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 muestra las medias de PM y GMD, que corresponden a diferentes edades del animal, así como la variación en CMD residual explicada por el intercepto, y la suma del intercepto y los efectos individuales (permanentes más genéticos) asociados a estas dos variables independientes (PM y GMD) del modelo de regresión aleatoria. La consideración de la GMD no supuso incremento alguno de la varianza explicada exclusivamente por el intercepto, mientras que la consideración del PM, particularmente a edades tardías del periodo de engorde, supuso un incremento importante de la varianza explicada. Este resultado indica que la variación en las necesidades de mantenimiento es la principal responsable de la variación en la eficiencia alimentaria; de hecho, en otros experimentos de selección por consumo de pienso residual (Barea et al., 2010; Boddicker et al., 2011) la respuesta observada parece deberse principalmente a reducciones de las necesidades de energía de mantenimiento y no tanto a reducciones en la energía destinada a crecimiento. La media (desviación típica) de la distribución marginal posterior de la heredabilidad para el intercepto fue de 0,22 (0,02), una estima de magnitud similar a la reportada en otras líneas (Cai et al., 2008; Gilbert et al., 2007). Para el CMD residual por unidad de PM la variación genética supone en torno a un 61% de la varianza individual, mientras que este valor es del 42% para el CMD residual por unidad de GMD. Los caracteres de calidad de carne considerados mostraron heredabilidades altas: 0,55 (0,08) y 0,27 (0,06) para GIM y pH24, respectivamente. Estos valores coinciden con otros publicados previamente para la misma línea (Casellas et al., 2010; Ros-Freixedes et al., 2013).

Se puede apreciar una relación genética desfavorable (Tabla 3) entre el CMD residual independiente de PM y de GMD (intercepto) y la GIM, resultado similar al encontrado en otros estudios (Cai et al., 2008; Gilbert et al., 2007). El intercepto y el CMD residual por unidad de GMD se asocian negativamente al pH24, es decir los animales más eficientes tenderían a producir una carne con un pH24 más elevado, siendo esto un resultado contrario al reportado por Gilbert et al. (2007). La magnitud de estas correlaciones, en cualquier caso, no alcanza valores tan extremos como para no permitir seleccionar a favor de la eficiencia manteniendo constantes los caracteres de calidad.

Se aprecia una correlación media entre el intercepto de CMD residual y TD180, y baja con P180. Con respecto al CMD residual como función del PM y de la GMD, alcanzaron relevancia las correlaciones entre ambos componentes de CMD residual y el P180, siendo negativa la del PM y positiva la de la GMD. Según los resultados obtenidos el criterio de selección considerado (reducción de TD180 y aumento de P180) reduciría de manera modesta el CMD residual, ya que las correlaciones entre los componentes de este último y el criterio de selección aunque parecen tener signos adecuados, tienen una magnitud pequeña. En este sentido, cabe señalar que dada la correlación estimada entre P180 y TD180 (0,63 (0,01)), la reducción de TD180 y el aumento de P180 simultáneamente parece difícil. En otras poblaciones más magras esta correlación no es de esperar que sea tan elevada. Así por ejemplo, en una línea maternal Landrace la estima de esta correlación fue 0,34 (Noguera et al., 2002) y en otra línea Pietrain la estima de la correlación entre edad a los 100 Kg y la grasa dorsal fue -0,44 (Bidanel et al., 1994).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barea et al. 2010. *J. Anim. Sci.* 88:2062-2072.
- Bidanel et al. 1994. *Ann Zootech* 43, 141-149.
- Boddicker et al. 2011. *Animal* 5:1344-1353.
- Cai et al. 2008. *J. Anim. Sci.* 86:287-298.
- Casellas et al. 2010. *J. Anim. Sci.* 88:2246-54.
- Gilbert et al. 2007. *J. Anim. Sci.* 85:3182-3188.
- Lonergan et al. 2001. *J. Anim. Sci.* 79 :2075–2085
- Noguera et al. 2002. *J. Anim. Sci.* 80:2540–2547
- Observatori del Porcí, 2013 (Generalitat de Catalunya)
- Piles et al. 2007. *J. Anim. Sci.* 85:2846-2853
- Ros-Freixedes et al. 2013. *J. Anim. Sci.* 91:3514-3521

Agradecimientos: Financiado por el proyecto RTA2011-00064-00-00, se han usado datos generados en los proyectos AGL2002-04271-C03-02 y CENIT MET-DEV-FUN. Parte del trabajo desarrollado en una estancia de J.P. Sánchez en ISU financiada por Excelmeat (IRSES-2009-246760). Se agradecen los comentarios de M. Baselga y al personal del Centro de Control Porcino, IRTA-Monells.

Tabla 1. Estadísticas descriptivas de los caracteres involucrados en el estudio

Trait	N. Datos	MEDIA	DT	Min	Max
CMD (Kg/d)	10610	2,76	0,58	0,93	4,67
GMD (Kg/d)	10610	0,87	0,14	0,35	1,39
GMETD (mm/d)	10610	0,15	0,08	-0,66	0,82
PM (Kg)	10610	26,22	5,19	12,0	40,61
pH24 (ud)	610	5,76	0,16	5,35	6,6
GIM (%)	492	5,54	2,02	1,38	13,3
P180 (Kg)	110012	104,9	12,24	62	167
TD180 (mm)	106123	15,6	3,44	5	36

Tabla 2. Varianza de CMD residual explicada por los componentes de la regresión aleatoria en función de las medias (desviadas del promedio general) de PM y GMD características de cada edad.

EDAD	Medias		Varianza de CMD residual (Kg ²)		
	PM	GMD	Inter.	Inter.+PM	Inter.+GMD
140	0,703	0,008	0,04(0,003)	0,04(0,003)	0,04(0,003)
147	2,204	0,014	0,04(0,003)	0,05(0,004)	0,04(0,003)
154	3,787	0,026	0,04(0,003)	0,07(0,005)	0,04(0,003)
161	5,339	0,018	0,04(0,003)	0,09(0,006)	0,04(0,003)
168	6,87	0,018	0,04(0,003)	0,11(0,008)	0,04(0,003)
175	8,553	0,039	0,04(0,003)	0,14(0,010)	0,04(0,003)

Tabla 3. Correlaciones genéticas (media (desviación típica) posterior) entre los componentes del consumo de pienso y los caracteres de calidad y los criterios de selección.

Componente	pH24	GIM	P180	TD180
intercepto	-0,35(0,12)	0,41(0,10)	0,20(0,11)	0,51(0,10)
PM	0,01(0,14)	0,17(0,12)	-0,31(0,13)	-0,06(0,14)
GMD	-0,46(0,17)	0,10(0,18)	0,31(0,15)	0,06(0,16)

FEED EFFICIENCY COMPONENTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH MEAT QUALITY TRAITS IN DUROC PIGS

ABSTRACT: This study reports estimates of the genetic correlations between feed efficiency (FE) components, ultimate pH (pH24), intramuscular content (IMF) and the selection criteria of the population: body weight (BW₁₈₀) and back fat (BF₁₈₀) at 180d. Average daily feed intake (FI), body weight (BW) and backfat thickness (BT) was weekly recorded from 15 to 26 weeks of age on 1076 pigs, and IMF and pH24 on 492 and 610 carcasses. FE components were defined from a random regression model for residual feed intake (RFI). The terms included were RFI per unit of metabolic weight (MBW), RFI per unit of ADG and an intercept, and for all these terms permanent and additive genetic effects were assumed. Individual variation in MBW is the only term having effect on RFI variation. High RFI intercept are associated with high content of intramuscular fat (0.41(0.10)) and low pH24 (-0.35(0.12)). The genetic correlation of RFI intercept with BF₁₈₀ was 0.51(0.10), and that between RFI per unit of MBW and BW₁₈₀ was -0.31(0.13); the genetic correlation between BF₁₈₀ and BW₁₈₀ was 0.63(0.01). These figures could make difficult the indirect improvement of FE through BF₁₈₀ and BW₁₈₀.

Keywords: Residual Feed Intake, Pigs, Meat Quality, Duroc.

PARÁMETROS GENÉTICOS DE LAS ENFERMEDADES MÁS COMUNES EN EL ENGORDE DE GAZAPOS BAJO DOS REGÍMENES ALIMENTARIOS

Ragab^{1,2}, M., Sánchez¹, J. P., Ramon¹, J., Rafel¹, O. y Piles¹, M.

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140, Barcelona, Spain.

²Poultry prod. Depart. Kafr El Sheikh University, 33516, Kafr El Sheikh, Egypt.
mohamed.mohamed@irta.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la producción de carne de conejo ha alcanzado un elevado potencial debido, en gran parte, a los desarrollos de líneas altamente especializadas y a los avances en nutrición. Sin embargo, en muchos casos este potencial no se plasma finalmente en incrementos reales de la producción debido, entre otros factores, a problemas derivados de la presencia de enfermedades tanto de etiología infecciosa (bacterianas, virales, parasitarias y micóticas) como no infecciosa (toxinas, estrés y metabólicas). Estas patologías causan importantes pérdidas económicas en la industria cunícula y además afectan al bienestar de los animales, por lo que la supervivencia durante el cebo tiene un peso económico relativamente alto (Carchute *et al.*, 2014). Obviamente, la incidencia de enfermedades en conejo es muy diferente en función de la edad del animal y del sistema de manejo al que se someta. Los procesos digestivos y respiratorios son los más frecuentes en conejos de engorde (Marlier *et al.*, 2003), pero si durante esta fase los animales se racionan parece ser que la incidencia de enfermedades digestivas se reduce de manera importante (Romero *et al.*, 2010). Las estimas publicadas de parámetros genéticos para la incidencia de enfermedades en conejo son escasas, aunque se conoce que ciertos caracteres asociados a incidencia de enfermedades pudieran presentar, incluso en condiciones comerciales, un control genético aditivo que pudiera aprovecharse en programas de mejora (Baselga *et al.*, 1988; Eady *et al.*, 2007; Garreau *et al.*, 2008). De hecho, algunos programas de mejora genética ya están utilizando la resistencia a la infección bacteriana como objetivo de selección (En Australia, Eady, 2003). Los objetivos de este trabajo fueron estudiar el efecto de dos regímenes de alimentación (*ad libitum* y restringida) durante la fase del engorde sobre la incidencia de las enfermedades más importantes y estimar los parámetros genéticos de estas enfermedades en ambas condiciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales de este experimento proceden de una línea paternal (Caldes) seleccionada por velocidad de crecimiento diario (VC) durante el periodo de engorde con alimentación *ad libitum*. Se engordaron en sucesivos lotes dos grupos de gazapos bajo las mismas condiciones ambientales y de manejo, siendo la única diferencia entre ellos la cantidad de pienso suministrada a cada grupo: Alimentación *ad libitum* (AD) y alimentación racionada al 75% del consumo a voluntad (RF). El período de cebo duró 5 semanas (32 – 67 días) y durante ellas el pienso usado para ambos grupos fue una dieta estándar. Los animales de una misma camada se distribuían entre los dos tratamientos en jaulas de 8 individuos. La distribución se hacía considerando también el tamaño. Se dispuso de 4024 y 3840 gazapos en los grupos AD y RF, respectivamente. Durante todo el período de cebo los gazapos se controlaban semanalmente para detectar signos de enfermedad y para los muertos se diagnosticó la causa más probable de la muerte. Los caracteres analizados fueron: mortalidad general o inespecífica (MO-I), y la morbimortalidad asociadas a procesos entéricos (EN), procesos respiratorios (RS) y mal estado general (ME), todos ellos considerados como caracteres binarios. Con los datos obtenidos se realizaron 4 análisis tri-variados con un modelo umbral-gausiano considerando como dos caracteres distintos la incidencia de cada enfermedad en cada una de las condiciones de alimentación, además de la información del criterio de selección desde la fundación de la línea. El modelo para VC incluyó los factores año-estación (280 niveles), tamaño de camada (7), orden de parto (4), camada de origen (21308) y el efecto genético aditivo (140261). Los modelos para la incidencia de las distintas enfermedades incluyeron los factores lote (14), tamaño de camada (7), orden de parto (4), peso al destete (2: bajo y alto), la camada de origen (1344), el grupo (jaula-lote) (956) y el efecto genético aditivo (140261). Los parámetros de este modelo se estimaron mediante un procedimiento bayesiano utilizando el programa thrgibbs1f90 de

Misztal *et al.* (2002). Se obtuvieron 100000 muestras de cada parámetro descartándose las primeras 10000; de estas se guardaron 1 de cada 100. Se utilizó la fórmula de Dempster y Lerner (1950) para transformar la heredabilidad de la escala subyacente a la escala observada.

RESULTADOS AND DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra que los animales RF tuvieron menos mortalidad inespecífica y presentaron una menor incidencia de enteropatía y de problemas respiratorios. Este resultado confirma los encontrados en estudios previos (Romero *et al.*, 2010; Gidenne *et al.*, 2012) que han servido para avalar las recomendaciones sobre la restricción alimentaria que la Association Scientifique Française de Cuniculture han hecho (Lebas, 2007) y que en este país siguen un gran porcentaje de cunicultores (Tudela, 2008). En nuestro estudio también se observa que los problemas digestivos son los más frecuentes durante el cebo y para ellos las diferencias entre mortalidad y morbimortalidad son importantes, independientemente del régimen alimentario, indicando que, aunque los animales presenten síntomas digestivos, un porcentaje elevado finaliza el cebo.

La heredabilidad (h^2) para VC (Tabla 2) se encuentra dentro del rango de heredabilidades obtenidas en ésta (Piles y Tusell, 2011) y otras líneas de conejos (Larzul y Gondret, 2005; Lavara *et al.*, 2011). Las estimas de h^2 en escala observada para todos los caracteres binarios fueron en general bajas y no se observan diferencias entre tratamientos. Estos valores de h^2 son similares a los reportados para prolificidad, carácter para el que se han llevado a cabo procesos exitosos de selección (García y Baselga, 2002) y similares a las publicadas anteriormente para este tipo de caracteres. Así, Baselga *et al.* (1988) obtuvieron una heredabilidad de los daños en el pulmón, causados por Pasterelosis de entre 0,12 y 0,28; Eady *et al.* (2007) obtuvieron para la presencia de signos de infección bacteriana (*S. aureus* y *P. multocida*) una h^2 de 0,12; Garreau *et al.* (2008) reportaron una h^2 de 0,08 para la presencia de trastornos digestivos. Las correlaciones genéticas (Tabla 3) entre los caracteres binarios y la VC resultaron ser en general bajas y negativas, lo que es compatible con otras estimas publicadas en conejos (Sorensen *et al.*, 2001; Garreau *et al.*, 2008). Por otra parte, todas las correlaciones genéticas entre los caracteres binarios bajo alimentación a voluntad y bajo restricción son claramente diferentes de 1, lo que apunta a una magnitud importante de la interacción entre el genotipo y el tipo de alimentación, a este respecto no se han encontrado estudios previos que aborden el estudio de esta interacción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baselga, M. et al. 1988. Proc. 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary.
- Carchute, L. et al., 2014. World Rabbit Sci. 22: 165-177.
- Dempster, E.R. & Lerner, I.M. 1950. Genetics 35: 212-236.
- Eady, S.J. 2003. RIRDC No 02/144.
- Eady, S.J. et al. 2007. Lives. Sci. 112: 90-98.
- Garreau, H. et al. 2008. Proc. 9th World Rabbit Congress. Verona, Italy.
- García M.L. & Baselga M. 2002b. World Rabbit Science 10:71-76.
- Gidenne et al. 2012. Prod. Anim. 25:323-336
- Larzul, C. & Gondret, F. 2005. Prod. Anim.18: 119-129.
- Lavara, R. et al. 2011. J. Anim. Breed. Genet. 128: 44-51
- Lebas, F. 2007. Cuniculture magazine. ASFC.
- Marlier, D. et al. 2003. Ann. Méd. Vét. 147, 385-392.
- Misztal, I. et al. 2002. Proc. 7th WCGALP, Montpellier, France.
- Piles, M. & Tusell, L. 2011. J. Anim. Breed. Genet. 1-8.
- Romero, C. et al. 2010. World Rabbit Sci. 18: 211-218.
- Sorensen, P. et al. 2001. World Rabbit Science 9: 33-38.
- Tudela, F. 2008, Proc. XXXIII Symposium de ASESCU. Calahorra, Spain.

Tabla1. Morbimortalidad y mortalidad específicas asociadas a cada enfermedad y mortalidad inespecífica.

		MO-I	EN	RS	ME
% Morbimortalidad	Ad libitum		10,51 ^a	2,36 ^a	2,66 ^a
	Restringida		8,15 ^b	1,61 ^b	2,86 ^a
% Mortalidad	Ad libitum	9,89 ^a	3,38	0,40	0,47
	Restringida	6,72 ^b	1,98	0,23	0,52

MO-I: Mortalidad Inespecífica; EN: Enteropatía; RS: Problemas Respiratorios; ME: Mal Estado General. ^{a, b}: Letras diferentes dentro de columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos en un test χ^2 .

Tabla 2. Medias (desviaciones típicas) de la distribución marginal posterior de las heredabilidades en la escala subyacente (h^2_{sub}) y observada (h^2_{obs}) para VC y la presencia de distintas enfermedades en el periodo de engorde.

Carácter	Ad libitum		Restringido	
	h^2_{sub}	h^2_{obs}	h^2_{sub}	h^2_{obs}
VC	-	0,14 (0,009)	-	-
MO-I	0,30 (0,06)	0,10 (0,022)	0,27 (0,06)	0,07 (0,017)
EN	0,17 (0,09)	0,06 (0,015)	0,17 (0,09)	0,05 (0,016)
RS	0,23 (0,05)	0,03 (0,007)	0,27 (0,08)	0,03 (0,008)
ME	0,20 (0,06)	0,03 (0,015)	0,38 (0,09)	0,06 (0,015)

VC: Velocidad de crecimiento; MO-I: Mortalidad Inespecífica; EN: Enteropatía; RS: Problemas Respiratorios; ME: Mal Estado General.

Tabla 3. Medias (desviaciones típicas) de la distribución marginal posterior de las correlaciones entre la velocidad de crecimiento (VC), y la presencia de una determinada enfermedad en condiciones de alimentación a voluntad (D_{AD}) o restringida (D_{RF}).

Caracteres implicados en la correlación genética			
Carácter	D_{AD}, VC	D_{RF}, VC	D_{AD}, D_{RF}
MO-I	-0,37 (0,08)	-0,34 (0,08)	0,68 (0,07)
EN	-0,29 (0,9)	-0,35 (0,06)	0,34(0,08)
RS	-0,18 (0,12)	0,02 (0,06)	0,26 (0,09)
ME	-0,31 (0,09)	-0,29 (0,06)	0,47 (0,10)

VC: Velocidad de crecimiento; MO-I: Mortalidad Inespecífica; EN: Enteropatía; RS: Problemas Respiratorios; ME: Mal Estado General.

GENETIC PARAMETERS OF COMMON RABBIT DISEASES UNDER TWO FEEDING SYSTEMS

ABSTRACT: Genetic parameters for average daily gain (**ADG**), unspecific mortality (**U-MO**), enteropathy (**EN**), respiratory symptoms (**RS**) and poor body condition (**ME**) and in Caldes line rabbits during the fattening period were estimated using Bayesian Trivariate Linear-Threshold Animal Models. 4024 and 3840 animals were reared under *ad libitum* (**AD**) and restricted feeding (**RF**) regimes. The kits of the same litter were distributed into both treatments ensuring that animals in a cage had a similar initial weight. For each disease, records obtained under different feed regimes were treated as different traits. The model for ADG included the effects of year-season, parity order, number born alive, additive genetic and litter. For every disease the model included parity order, number born alive, batch, size of the animal at weaning, additive genetic, litter and cage group effects. The heritabilities on the liability scale were converted to the observed scale. Estimates were found to be between 0,03 and 0,10, and for all the diseases they were equal under both treatments. The genetic correlations between feeding regimens were far from 1, suggesting the existence of genotype by feeding regimen interaction. The genetic correlations between VC and all of the diseases under both feeding regimens were moderate and negative.

Keywords: Rabbit, Diseases, Feeding regime, GxE interaction

COMPARACIÓN DE LA DURACION DE LA INMOVILIDAD MUSCULAR, EL COCIENTE ENTRE HETEROFILOS Y LINFOCITOS Y LA ASIMETRÍA FLUCTUANTE DE POLLITOS CRIADOS CON O SIN GALLINA CLUECA

Gil, M.G., Dávila, S.G. y Campo, J.L.
Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid. ggil@inia.es

INTRODUCCIÓN

En avicultura, los pollitos se incuban artificialmente y se crían sin la presencia de la madre. Sin embargo, la atención materna puede tener efectos positivos en el comportamiento de los pollitos durante su desarrollo. Fålt (1978) indicó que el comportamiento era más agresivo en pollitos criados sin la presencia de madre que en los criados con madre y Perré et al. (2002), observaron que pollitos criados sin una clueca, comparados con los que se crían con ella interaccionan más agonísticamente cuando se encuentran con aves extrañas. Por otra parte, cuando los pollitos se criaban con una madre, se reducía el picaje de plumas y el canibalismo (Rodenburg et al., 2004; Riber et al., 2007).

Sería interesante conocer si los pollitos que se han criado con una gallina o solos, reaccionan de manera diferente frente a situaciones de miedo o estrés. La inmovilidad muscular en gallinas es un conocido comportamiento anti-predador, y es una medida ampliamente utilizada para medir el nivel de miedo en muchas especies (Forkman et al., 2007). En gallinas cluecas y no cluecas se ha analizado sólo en un estudio previo realizado por Perré et al. (2002), en el que no encuentran diferencias en la inmovilidad muscular ni en otras dos medidas de miedo. Roden y Wechsler (1998), Rodenburg et al. (2009), Shimmura et al. (2010), encontraron que pollitos criados con una gallina clueca tenían menos miedo, con otras pruebas diferentes para medir el miedo.

El presente estudio tiene como objetivo determinar si la cría con una gallina clueca influye en la inmovilidad muscular, en el cociente entre heterofilos y linfocitos (indicador de estrés asociado con la concentración de corticoesteroides, Davis et al., 2008) y en la asimetría fluctuante, de cuatro caracteres bilaterales, que está descrito como un indicador que refleja el nivel de estrés durante el desarrollo del animal (Møller y Swaddle, 1997),

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron gallinas de las 12 razas del Programa de Conservación que se inició en el año 1975 y que se realiza en la granja experimental de El Encín, Madrid, (Campo, 1998). De estas razas se observaron 24 gallinas que estuvieran cluecas. Esta cloquez se produjo de forma natural con el cambio en la duración de la luz y la temperatura en junio. Las gallinas criaron a los pollitos de un cruce entre la raza Andaluza Franciscana y la Castellana Negra que se incubaron juntos hasta el día de la eclosión. En ese momento, cada una de las 24 gallinas se alojó con siete de estos pollitos, utilizando además igual número de pollitos del este cruce que se alojaron en 24 celdas sin gallina. A la sexta semana de edad se les midió la inmovilidad muscular, el cociente de heterofilos y linfocitos y la asimetría fluctuante de cuatro caracteres bilaterales. Las medidas se tomaron en 120 pollitos, 60 criados con clueca y 60 criados solos (2 ó 3 muestreados al azar de cada gallina o celda elegido al azar). Los datos de la inmovilidad muscular se transformaron logarítmicamente ya que no tiene una distribución normal, al igual que los del cociente entre heterofilos y linfocitos en los que se hizo una transformación raíz cuadrada de los datos. Para asimetría fluctuante se midió la longitud y anchura de pata, la longitud del dedo medio y la longitud de ala. La asimetría fluctuante se definió por el valor absoluto de la diferencia entre lados. Se siguió el protocolo experimental indicado por Knierim et al. (2007) para identificar la asimetría como fluctuante y separarla del error de medida (Campo et al., 2005). Para el análisis se utilizó la asimetría fluctuante relativa, dividiendo el valor absoluto por la media del carácter. La asimetría relativa no tiene una distribución normal, por lo que se hizo la transformación arcoseno de la raíz cuadrada. Se utilizó un diseño jerárquico (Sokal y Rohlf, 1981): $x_{ijkl} = \mu + G_i + b_{j(i)} + p_{k(ij)} + e_{ijkl}$, donde G_i es el efecto del grupo (criado con o sin gallina clueca), $b_{j(i)}$ es el efecto de la raza dentro de los grupos, $p_{k(ij)}$ es el efecto del gallinero dentro de las razas y grupos, e_{ijkl} es el error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los valores medios de la duración de la inmovilidad muscular, del cociente entre heterofilos y linfocitos y la asimetría fluctuante de pollitos, criados con o sin gallina clueca, incluyendo el cuadrado medio del error, F-valor y P-valor. Se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para duración de la inmovilidad muscular ($P < 0,0001$), teniendo los pollitos criados con una gallina clueca tienen una inmovilidad muscular significativamente más corta que los criados sin ella. No se vió un efecto significativo del método de cría en el cociente de leucocitos, el número de heterofilos y el de linfocitos era similar. No se encontraron diferencias significativas entre pollitos criados con o sin gallina clueca para la asimetría fluctuante de los cuatro caracteres estudiados. Aunque para la asimetría fluctuante de la longitud del ala y para la asimetría fluctuante combinada, se apreciaba una tendencia a la significación ($P < 0,06$).

Los pollos criados con una clueca, tenían una disminución del miedo, como indica la menor duración de la inmovilidad muscular, mostrando que la presencia de una gallina clueca con sus diferentes comportamientos de atención maternal, mantiene el control de sus pollitos (Fält, 1978; Riber et al., 2007; Wauters et al., 2002). Roden y Wechsler (1998), Rodenburg et al. (2009), y Shimmura et al. (2010) obtuvieron unos resultados similares utilizando diferentes indicadores del nivel de miedo, confirmando lo indicado por Jones (1987) quien encontró estimaciones de correlación altas entre la inmovilidad muscular y otro tipo de pruebas para medir la respuesta al miedo. Perré et al. (2002) obtuvieron resultados diferentes a los nuestros, obteniendo una inmovilidad muscular similar en los pollos criados con o sin clueca hasta las 8 semanas. Sin embargo, las observaciones de la inmovilidad muscular a las 14 y a las 24 semanas de edad, y la influencia maternal podría ser mayor cuando los pollitos son más jóvenes, pudiendo disminuir con la edad.

En nuestro trabajo, la cría con una gallina clueca no afectó al nivel de estrés en pollitos como indica el similar cociente de heterófilos y linfocitos y de la asimetría fluctuante, lo que sugiere que no hubo cambios simultáneos en miedo y estrés durante la cría. El resultado para la asimetría fluctuante puede ser tentativo ya que en la longitud de ala y para la asimetría fluctuante combinada de los cuatro caracteres el efecto grupo se aproxima al nivel de significación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campo, J. L. 1998. 6th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. pp. 155-158
- Campo, J.L et al. 2005. Appl. Anim. Behav. Sci. 113, 87–97.
- Davis, A.K. 2008. Funct. Ecol. 22,760–772.
- Fält, B. 1978. Appl. Anim. Ethol. 4, 211–221.
- Forkman, B. et al. 2007. Physiol. Behav. 92, 340–374.
- Jones, R.B. 1987. Br. Poultry Sci. 28, 319–326
- Knierim, U et al. 2007. Physiol. Behav. 92, 398–421.
- Møller, A.P. & Swaddle, J.P. 1997. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Perré, Y. et al, 2002. Appl. Anim. Behav. Sci. 75, 133–146.
- Riber, A.B et al. 2007. Appl. Anim. Behav.Sci. 106, 39–51.
- Roden, C. & Wechsler, B. 1998. Appl. Anim.Behav. Sci. 55, 317–326.
- Rodenburg, T.B. et al. 2004. Behav. Proc. 65, 179–188.
- Rodenburg, T.B. et al. 2009. Anim.Welfare 18, 427–432.
- Shimmura, T. et al. 2010. Appl. Anim. Behav.Sci. 126, 125–133.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1981. Freeman & Co. London, UK.
- Wauters, A.M. 2002. Chronobiol. Int. 19, 543–559.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el proyecto RZP2012-00001-00-00

Tabla 1. Medias de la inmovilidad muscular (IM), el cociente entre heterofilos y linfocitos (H:L) y la asimetría fluctuante (AF)^a de longitud de pata (LP), anchura de pata (AP), longitud del dedo medio (LD), longitud del ala (LA) y la asimetría fluctuante combinada para los cuatro caracteres (C) de pollitos criados con o sin gallina clueca (n = 120).

	IM(s)	H:L	LP	AP	LD	LA	C
Método de cría							
Con gallina clueca	308 ^d	0,26 ^c	1,30 ^c	4,32 ^c	3,93 ^c	2,98 ^c	3,13 ^c
Sin gallina clueca	445 ^c	0,24 ^c	1,35 ^c	5,13 ^c	3,17 ^c	2,37 ^c	3,01 ^c
Cuadrado medio error	33820	0,02	1,36	21,48	10,73	6,62	3,17
F-valor ^b	16,64	0,30	0,19	2,01	0,95	2,50	2,48
P-valor	0,0001	0,58	0,90	0,11	0,42	0,06	0,06

^a $[2 |D-I|/(D+I)]$; D= lado derecho; I=lado izquierdo

^b Con 1 y 118 grados de libertad

Las medias de las columnas con el superíndice diferente (c,d) indican diferencias significativas

COMPARISON OF THE TONIC IMMOBILITY DURATION, HETEROPHIL TO LYMPHOCYTE RATIO, AND FLUCTUATING ASYMMETRY OF CHICKS REARED WITH OR WITHOUT A BROODY HEN

ABSTRACT: The purposes of this study were to determine whether rearing with a broody hen influenced duration of tonic immobility, heterophil to lymphocyte ratio, and relative fluctuating asymmetry of chicks. A total of 120 chicks (60 reared with a broody hen and 60 reared without a broody hen), were analyzed at 6 weeks of age. Broody hens were observed in 12 different Spanish breeds and all the chicks were from an F 1 cross between the Black-barred Andaluza and the Black Castellana breeds. Tonic immobility duration was significantly longer ($P < 0.0001$) in chicks reared without a broody hen than in those reared with a broody hen, suggesting that the presence of a broody hen reduces fear in chicks. There were no significant differences in the heterophil to lymphocyte ratio and the relative fluctuating asymmetry of leg length, leg width, and toe length, although the fluctuating asymmetry of wing length and the combined fluctuating asymmetry value of the 4 traits tended to be significant. These results suggest no effect on stress in chicks in the presence of a broody hen.

Keywords: Broody hen, tonic immobility duration, heterophil to lymphocyte ratio, relative fluctuating asymmetry

MODELIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD MUTACIONAL SEGÚN LA EDAD DE LOS PROGENITORES EN RATONES C57BL/6J

Castillo¹, M., Medrano², J. F. y Casellas¹, J.

¹Dep. Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. joaquim.casellas@uab.cat. ²Dep. of Animal Science, University of California, Davis, California, 95616-8521, EUA.

INTRODUCCIÓN

Las mutaciones se presentan frecuentemente en mamíferos y son de gran interés, bien sea porque poseen un valor intrínseco evolutivo que se fundamenta en la variabilidad genética que producen, o bien porque pueden representar una amenaza por sus posibles efectos deletéreos. Las nuevas mutaciones se originan aleatoriamente, pueden aparecer en cualquier parte del genoma, y se heredaran influyendo en el fenotipo de las generaciones sucesivas. Partiendo de esta premisa, podemos inferir que la variabilidad genética en cualquier población de animales deriva en parte de la contribución de múltiples mutaciones que van apareciendo de generación en generación. Si bien la importancia de la variabilidad producida por las mutaciones ha sido sugerida por varios investigadores en las últimas décadas (Hill, 1982a,b; Caballero et al., 1991; Keightley, 1998; Casellas y Medrano, 2008), existen pocas estimaciones de la varianza mutacional en mamíferos, y la influencia que ejercen ciertos factores como la edad de los progenitores sobre la variabilidad mutacional es muy poco conocida.

La presente investigación se fundamenta en la modelización de la varianza mutacional de origen paterno y materno sobre el peso a las tres semanas de edad en ratones C57BL/6J; adaptando los procedimientos desarrollados por Wray (1990) sobre la base de los modelos BLUP de evaluación genética (Henderson, 1973), se pretende no solamente estimar la magnitud de la varianza mutacional sino también como evoluciona esta a medida que envejecen los progenitores.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó utilizando como fuente de datos una cepa consanguínea C57BL/6J, que fue mantenida en la Universidad de California (Davis, California, EUA) durante 46 generaciones no solapadas, entre octubre de 1988 y mayo de 2005. Esta línea fue fundada a partir de dos machos y seis hembras procedentes de *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EUA). Se produjeron de 2 a 5 generaciones por año y cada generación involucraba entre 2 y 28 machos, y entre 6 y 49 hembras, produciendo un promedio de 21,6 camadas; el número de camadas por generación era muy variable en función de la necesidad de ratones para experimentación. Para obtener cada nueva generación, se seleccionaron machos y hembras al azar de unas pocas camadas de la generación anterior, favoreciendo los apareamientos entre hermanos completos. Todos los ratones fueron alimentados con pienso Purina 5008 (Ralston Purina Company, St. Louis, Missouri, EUA; 23,5% de proteína, 6,5% de grasa, 3,3 kcal/g) y el agua se ofreció *ad libitum*. Los animales fueron alojados en jaulas de policarbonato en condiciones controladas de temperatura (21° ± 2°), humedad (40-70%), e iluminación (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad), y se manejaron de acuerdo con las directrices de la *American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care* (<http://www.aaalac.gov>). En todas las generaciones se registraron padre y madre, fecha de apareamiento, fecha de nacimiento y número de crías al nacer (vivos y muertos). Los ratones se pesaron al destete (3 semanas de edad) y fueron marcados individualmente mediante muescas en las orejas. Una vez editados los datos se analizaron los pesos al destete de 12.644 ratones (10,48 ± 0,02 g) con una genealogía compuesta por 13.024 animales.

Los análisis se realizaron bajo el siguiente modelo,

$$y = Xb + Z_1p + Z_2a + Z_2m_p + Z_2m_m + e$$

donde **y** era el vector de fenotipos influidos por efectos sistemáticos (**b**), ambientales permanentes de la camada (**p**), genéticos aditivos (**a**), y mutacionales de origen paterno (**m_p**) y materno (**m_m**), **e** era el vector de residuos, y **X**, **Z₁** y **Z₂** eran las matrices de incidencias respectivas. Desde un punto de vista Bayesiano, se asumió que los datos seguían una distribución normal multivariante,

$$p(y|b,p,a,m_p,m_m,\sigma_e^2) = NMV(Xb + Z_1p + Z_2a + Z_2m_p + Z_2m_m, I\sigma_e^2)$$

donde σ_e^2 correspondía a la varianza residual del carácter. También se asumieron distribuciones normales multivariantes para los efectos ambientales permanentes y genéticos aditivos,

$$p(\mathbf{p}|\sigma_p^2)=NMV(\mathbf{0},\mathbf{I}\sigma_p^2) \quad p(\mathbf{a}|\mathbf{A},\sigma_a^2)=NMV(\mathbf{0},\mathbf{A}\sigma_a^2),$$

siendo σ_p^2 la varianza ambiental permanente, σ_a^2 la varianza genética aditiva, y \mathbf{A} la matriz de parentescos aditivos. En cuanto a los efectos mutacionales, se partió del procedimiento descrito por Wray (1990) para computar las matrices parciales de parentescos mutacionales condicionadas a cada individuo "i" de la genealogía (\mathbf{M}_i), siendo $\mathbf{m}_p = \mathbf{m}_{p,1} + \mathbf{m}_{p,2} + \dots + \mathbf{m}_{p,13024}$ la suma de los efectos mutacionales paternos condicionados a las nuevas mutaciones acaecidas en cada individuo. Así pues, la distribución a priori para $\mathbf{m}_{p,i}$ (y también para $\mathbf{m}_{m,i}$) se asumió normal multivariante,

$$p(\mathbf{m}_{p,i}|\mathbf{M}_i,\sigma_{mp}^2,\lambda_p)=NMV(\mathbf{0},\mathbf{0.5M}_i\sigma_p^2[1+\epsilon_{p,i}\lambda_p]),$$

con la salvedad de jerarquizar la varianza mutacional paterna (σ_{mp}^2), incluyendo en el modelo la edad del padre en el momento de concebir al individuo i ($\epsilon_{p,i}$), así como el coeficiente de regresión lineal correspondiente sobre dicho parámetro (λ_p); para los demás parámetros del modelo se asumieron distribuciones a priori planas. El análisis se realizó mediante procedimientos de cadenas de Markov de Monte Carlo, realizando un total de 500,000 iteraciones después de descartar las primeras 10,000 como *burn-in*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como se detalla en la Tabla 1, la variabilidad genética en esta línea de ratones consanguíneos resultó relativamente alta, tanto en lo referente a la varianza genética aditiva presente ya en la generación de fundadores (σ_a^2), como en el caso de la variabilidad originada *de novo* a partir de mutaciones. Mientras que σ_a^2 explica aproximadamente el 9% de la variabilidad total, la varianza mutacional tanto paterna como materna presenta valores mucho más bajos, aunque su intervalo de credibilidad descarta claramente el cero; de hecho, los resultados sugirieron que la varianza mutacional paterna podía ser ligeramente superior a la materna, aunque sus intervalos de credibilidad se solapaban claramente. Al considerar la posibilidad de que estas varianzas mutacionales puedan evolucionar con la edad de los progenitores, el análisis reportó un comportamiento claramente antagónico entre los dos sexos. Mientras la varianza mutacional de origen paterno aumentaba linealmente con la edad del padre (Figura 1), la varianza mutacional materna no evidenció ningún tipo de evolución relacionada con la edad de la madre. Esto sugeriría que se podría estar dando una acumulación de nuevas mutaciones en las células germinales de los machos a lo largo de su vida reproductiva, tal como se ha sugerido en otras especies como la humana dentro del ámbito de la base genética del autismo (Callaway, 2012), mientras que en hembras el impacto de las nuevas mutaciones sería independiente de la edad.

Estos resultados evidencian la importancia de las nuevas mutaciones incluso en líneas de animales de laboratorio consideradas isogénicas, permitiendo un mejor conocimiento de la arquitectura genética de los mamíferos, así como caracterizando detalladamente el comportamiento diferencial del patrón mutacional en función del sexo de cada progenitor implicado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Callaway, E. 2012. *Nature* 488:439
- Casellas, J., Medrano, J.F. 2008. *Genetics* 179:2147-2155
- Caballero, A., Toro, M.A., López-Fanjul, C. 1991. *Genetics* 127:89-102
- Henderson, C.R. 1973. *Proc. Anim. Breed. Genet. Symp. In Honor of Dr. Jay L Lush*. ASAS-ADSA, Champaign, IL, EUA, 10-41
- Hill, W.G. 1982a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:142-145
- Hill, W.G., 1982b. *Genet. Res.* 40:255-278
- Keightley, P.D. 1998. *Genetics* 148:1931-1939
- Wray, N. R., 1990. *Biomet.* 46: 177-186.

Agradecimientos: A Vince De Vera por el cuidado de los animales y la recopilación de la información tanto genealógica como fenotípica. Este trabajo se engloba dentro de la tesis doctoral de M. Castillo, financiada a través del Programa de Becas, Autorizaciones y Sabáticos de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela). La posición de investigación de J. Casellas se vincula al programa Ramón y Cajal (RYC-2009-04049).

Tabla 1. Caracterización de los componentes de varianza y parámetros relacionados correspondientes al análisis del peso a las tres semanas en ratones C57BL/6J.

Parámetro ^a	Media	Percentiles (2,5% a 97,5%)
σ_a^2	0,411	0,192 a 0,583
σ_p^2	1,513	0,879 a 2,115
σ_e^2	2,089	1,731 a 2,257
σ_{mp}^2	0,113	0,069 a 0,163
λ_p	0,001	10^{-5} a 0,051
σ_{mm}^2	0,052	0,020 a 0,097
λ_m	0,000	— ^b

^aVarianzas genética aditiva (σ_a^2), ambiental permanente (σ_p^2), residual (σ_e^2), y mutacional paterna (σ_{mp}^2) y materna (σ_{mm}^2), además de los coeficientes de regresión sobre la edad del padre (λ_p) y la madre (λ_m) en el momento de la concepción de cada individuo.

^bLos muestreos para λ_m confluyeron a cero

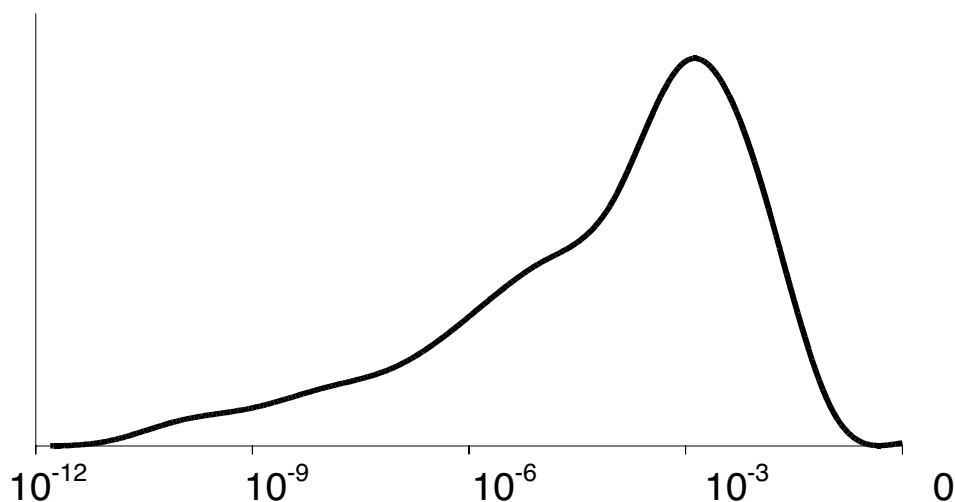


Figura 1. Distribución marginal posterior para el efecto de la edad (días) sobre el componente de varianza mutacional paterna.

ACCOUNTING FOR MUTATIONAL VARIABILITY IN C57BL/6J MICE ON THE BASIS OF PARENT'S AGE

ABSTRACT: New mutations are a very relevant component of polygenic variability. Nevertheless, the biological phenomena that originate new mutational variants are poorly understood, particularly in regard to the impacts that factors like a parent's age may have. This research focuses on the analysis of weaning weight in 12,644 C57BL/6J mice from 46 non-overlapping generations. The analytical model used included systematic, permanent environmental and genetic sources of variation, and accounted for independent mutational contributions from each parent. This parameterization allowed us to clearly characterize different mutational patterns associated with the sex of the parent. Whereas the variability of the mutational load from male parents increased with age, mutational variance originating in female parents remained constant along the female's reproductive lifespan.

Keywords: C57BL6J mice, age-related mutation, polygenic variability, weaning weight

VARIANTES RARAS: ERRORES DE SECUENCIACIÓN Y HEREDABILIDAD FALTANTE

González-Recio¹, O., Daetwyler, H.D., MacLeod, I.M., Pryce, J.E., Bowman, P.J., Hayes, B.J. y Goddard, M.E.

¹Department of Environment and Primary Industries, Bundoora, Victoria 3083, Australia.
ogrecio@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El uso masivo de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) en los modelos de análisis de varianza no han sido capaces, en la mayoría de las ocasiones, de recuperar toda la varianza aditiva genética que explican las relaciones de parentesco genealógico (Manolio et al., 2009). Este efecto es conocido como heredabilidad faltante, y ocurre incluso utilizando todos los marcadores simultáneamente en poblaciones ganaderas donde la genealogía es amplia y fiable (Jensen et al., 2012; Haile-Mariam et al., 2013, Roman_Ponce et al., 2014).

Una de las hipótesis para explicar la heredabilidad faltante es el desequilibrio de ligamiento incompleto entre los SNPs y las mutaciones causales, especialmente aquellas que aparecen en frecuencias alélicas bajas en las poblaciones (Gibson, 2012). La teoría conocida como variantes raras-enfermedades complejas ha sido respaldada por algunos autores, aunque aún no ha podido ser comprobada o refutada. El proyecto "1000 Bull Genome Project" (Daetwyler et al., 2014) ofrece la posibilidad de utilizar las variantes provenientes de la secuenciación para estudiar la problemática de la heredabilidad faltante y mejorar la precisión de las evaluaciones genéticas. Sin embargo, la secuenciación tiene asociada un error estimado en el 1% (trabajos previos no publicados), pero este valor es una media global, y no tiene en cuenta la frecuencia alélica.

El objetivo de este estudio es validar las variantes raras en dúos de padre-hijo para diferenciarlas de errores de secuenciación, y estimar que proporción de heredabilidad faltante explican las variantes raras en la población Holstein, así como su contribución a la mejora de la precisión de las evaluaciones genéticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se usaron 429 secuencias de individuos provenientes de 15 razas del proyecto "1000 Bull Genomes Project". Tras el control de calidad (McKenna et al., 2010; Grant et al., 2011; Purcell et al., 2007), se seleccionaron 2.785.440 variantes (SNP e indels) en regiones codificantes y aquellas en regiones proximales (± 2000 pb "up-" y "downstream") a las regiones codificantes. De ellas se filtraron aquellas en desequilibrio de ligamiento menor a 0,9999 (675.062). Las secuencias de los individuos de raza Holstein (122) y Jersey (26) fueron utilizadas como conjunto de referencia para la imputación (Browning y Browning, 2009) de 3.311 toros Holstein con genotipo basado en el chip "Bovine HD SNP" (632.002 SNP después de aplicar control de calidad y filtrado).

Las variantes genómicas se clasificaron como comunes ($MAF > 0,05$), infrecuentes ($0,01 < MAF < 0,05$) y raras ($MAF < 0,01$). Con el propósito de diferenciar variantes raras de errores de secuenciación se seleccionaron sólo aquellas variantes que al menos aparecieran en 2 de los animales secuenciados, y se evaluó el porcentaje de variantes raras que son errores de secuenciación utilizando 38 dúos de padres e hijos. En total se usaron 83.856 variantes raras en regiones codificantes y proximales, de las 4.442.216 encontradas en el total del genoma. El número de variantes infrecuentes fue de 102.549.

Los caracteres analizados fueron las desviaciones fenotípicas de las hijas corregidas por efectos ambientales y maternos para litros de leche (KL), kg de grasa (KG), kg de proteína (KP), e intervalo entre partos (IP) como indicador de fertilidad. Los componentes de varianzas se estimaron utilizando modelos mixtos con matriz de relaciones genómicas (GBLUP), incorporando las variantes comunes, infrecuentes y raras de manera sucesiva, y realizando una comparación de modelos por medio del test del cociente de la verosimilitud. Los análisis se implementaron con el programa ASReml 3 (Gilmour et al., 2009). La capacidad predictiva de las secuencias y las variantes raras se evaluó en un escenario de

validación cruzada con 2.832 toros Holstein como conjunto de referencia, y 465 toros descendientes de estos como conjunto de validación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Más de la mitad de las variantes genómicas detectadas en la secuenciación presentaron $MAF < 0,02$ (Figura 1, izquierda). La Figura 1 (derecha) muestra la proporción de variantes alélicas para el alelo de menor frecuencia, que estando en heterocigosis en el padre, aparecen también en el hijo para 38 dúos, en función de la frecuencia de los alelos menores. Para los alelos raros y de menor frecuencia, la probabilidad es cercana a 0,50. Sin embargo, la proporción observada en los dúos fue la mitad (0,25). Esto indica que aproximadamente la mitad de las variantes raras detectadas durante los procesos de identificación de variantes en la secuenciación del genoma son errores de secuenciación. Para los loci con MAF entre 0,02 y 0,05, los errores de secuenciación son todavía altos, y a partir de $MAF > 0,10$, las proporciones observadas en la progenie se aproximan a lo esperado por herencia mendeliana.

En cuanto a la varianza genética explicada por los marcadores, el genotipado de alta densidad capturó entre el 81 y el 93% de la varianza genética aditiva en comparación con el pedigrí (heredabilidad faltante de entre 7 (IP) y 19 (KG) %). Las variantes comunes provenientes de secuencias tampoco capturaron la misma varianza genética que el pedigrí, (heredabilidad faltante de 10% (KL), 17% (KG), 15% (KP) y 2% (IP)). Para los caracteres de producción esta heredabilidad faltante es mayor a la esperada cuando no se cuenta con la secuenciación de los individuos de la población base, nuestro caso fue del 5%. Para el IP, nuestros análisis indican que la secuenciación si recupera toda la heredabilidad esperada.

La Tabla 1 muestra el porcentaje de varianza explicada por las variantes comunes, el pedigrí, variantes infrecuentes y las variantes raras cuando se introducen simultáneamente en el modelo. Las variantes comunes capturaron la mayor parte de la varianza aditiva total (entre el 76 y el 84%). Las relaciones de parentesco capturaron el 23% (KL y KP) y 14% (KG) en los caracteres productivos ($P > 0,01$). Las variantes infrecuentes y raras no capturaron varianza aditiva de forma relevante ni significativa, tan sólo un 3% de ésta fue explicada por las variantes raras para KG. Sin embargo, las relaciones de parentesco no capturaron más del 2% de la varianza, acorde con lo esperado ya que las variantes comunes fueron la única fuente de información en el modelo, tal como se explica más arriba. Las variantes raras en cambio explicaron el 14% de la varianza genética aditiva total. A pesar de las diferencias en la proporción de varianza aditiva capturada, las predicciones en validación cruzada no mejoraron sustancialmente utilizando datos de secuenciación con respecto a los genotipados de SNPs. Las variantes comunes mejoraron entre un 2 y un 3 % la capacidad predictiva de los chips de SNPs sólo para los caracteres KL y KG. Las variantes raras sólo mejoraron un punto (2%) la precisión de las predicciones de IP. Cabe destacar que éstas son estimas puntuales y no se estimó su incertidumbre.

Estos resultados implican que aunque las variantes genómicas comunes pueden explicar la mayor parte de la varianza genética aditiva, existe una pequeña proporción que no es posible capturar, al menos contando sólo con las regiones codificantes y sus regiones proximales. Las variantes raras no son la causa de la heredabilidad faltante en caracteres que han sido objeto de una selección intensa, pero si en aquellos sujetos a menor intensidad de selección o caracteres de "fitness". Es necesario desarrollar estrategias que sean capaces de estimar de forma precisa el efecto de estas variantes raras para implementar su selección o purga en los programas de mejora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Browning, B.L. & Browning, S.R. 2009. *Am. J. Hum. Genet.* 84: 210-223
- Daetwyler, H.D., et al. 2014. *Nat. Genet.* doi:10.1038/ng.3034
- Gibson, G. 2012. *Nat. Rev. Genet.* 13: 135-145.
- Gilmour, A.R., et al. 2009. *ASReml User Guide Release 3.0.* VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK www.vsnl.co.uk
- Grant, J.R., et al. 2011 *Bioinformatics* 27: 2300-2301.
- Haile-Mariam, M., et al. 2013. *J. Anim. Breed. Genet.* 130(1): 20-31.
- Jensen, J., et al. 2012. *Genet. Sel. Evol.* 13: 44.
- Manolio, T.A., et al. 2009. *Nature* 461: 747-753.
- McKenna, A., et al. 2010. *Genome Res.* 20: 1297-303.
- Purcell, S., et al. 2007.

Agradecimientos: Los autores agradecen la financiación de "CRC dairy futures", así como al proyecto "1000 bull genomes" y a ADHIS por la cesión de los datos utilizados.

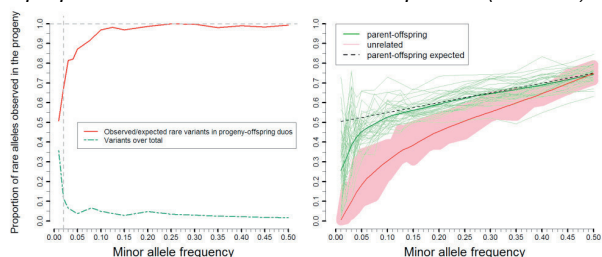
Tabla 1. Proporción de heredabilidad explicada por cada fuente de información. Se indica el nivel de significación del test del cociente de la verosimilitud de los modelos.

	Variantes comunes	Pedigrí	Variantes infrecuentes	Variantes raras
Grasa (kg)	83%	14%**	0%	3% [†]
Leche (L)	77%	23%**	0%	0%
Proteína (kg)	76%	23%**	0%	1%**
Fertilidad (días)	84%	2%	0%	14%**

Tabla 2. Precisión (*cor*) y error cuadrático medio (EMC) de la predicción genómica. El set de referencia fueron 2832 machos Holstein, y el set de validación 465 toros descendientes de aquellos.

Carácter	SNP chip Bovine HD ¹		Variantes comunes		Variantes comunes y raras	
	<i>cor</i>	EMC	<i>cor</i>	EMC	<i>cor</i>	EMC
Grasa (kg)	0,60	146	0,57	143	0,57	143
Leche (L)	0,61	114261	0,63	110916	0,63	110923
Prot (kg)	0,65	81	0,65	81	0,65	81
Fertilidad (días)	0,42	182	0,42	182	0,43	182

Figura 1. Proporción observada de alelos transmitidos a la progenie y proporción de variantes sobre el total en función de la frecuencia alélica (izquierda), y proporción de variantes transmitidas a la progenie en 38 dúos de padre-hijo y dúos de animales no emparentados y la proporción de transmisión alélica esperada (derecha).



RARE VARIANTS: SEQUENCING ERRORS AND MISSING HERITABILITY

ABSTRACT: Sequence variants in coding regions from 429 sequenced animals were used to impute high density SNP genotypes of 3311 Holstein sires to sequence. There were 675,062 common variants (MAF>0.05), 102,549 uncommon variants (0.01<MAF<0.05), and 83,856 rare variants (MAF<0.01). We estimated that ~ 50% of variants with MAF<0.01 are sequencing errors. Common sequence variants captured 83%, 77%, 76% and 84% of the total genetic variance for fat, milk, and protein yields and fertility, respectively, using GBLUP. Rare variants captured 3%, 0%, 1% and 14% of the genetic variance for fat, milk and protein yields, and fertility respectively, whereas pedigree explained the remaining amount of genetic variance (none for fertility). Using common sequence variants slightly improved accuracy of genomic predictions. However, rare variants only increase the predictive ability of fertility by 2%. These results suggest that rare variants recover a small percentage of the missing heritability for complex traits, however very large reference sets will be required to exploit this in genomic evaluations for fitness traits like fertility.

Keywords: Rare variants, next generation sequencing, missing heritability, genomic prediction.

REGIONES CON ALTA PERMANENCIA DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO ENTRE LAS POBLACIONES DE VACUNO DE CARNE ESPAÑOLAS

Mouresan, E. F., González-Rodríguez, A., Cañas-Álvarez, J. J., Munilla, S., Moreno, C., Altarriba, J., Baro, J. A., Díaz, C., Molina, A., Piedrafita, J. y Varona, L.
.Universidad de Zaragoza. c/ Miguel Servet 177. 50013. ZARAGOZA. mouresan@unizar.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la disponibilidad de genotipado masivo de marcadores SNP ha permitido el desarrollo de procedimientos de evaluación genómica (Meuwissen et al., 2001). La evaluación genómica se ha constituido en una herramienta imprescindible en vacuno de leche (Hayes et al., 2009), sin embargo su utilización en vacuno de carne es más discutible, debido al menor censo de las poblaciones y a la menor implantación de la inseminación artificial. Este problema podría ser solventado a través de la evaluación genómica de poblaciones múltiples, pero los resultados obtenidos tanto mediante simulación (Mouresan et al., 2014) como con datos experimentales (Kachman et al., 2013) son poco esperanzadores.

El éxito de la evaluación genómica a partir de varias poblaciones está ligado a la persistencia de fase de ligamiento entre ellas, de tal manera que el desequilibrio de ligamiento entre marcadores y QTL se mantenga. Varios autores han estudiado la persistencia de la fase entre poblaciones como una medida más de la diversidad genética (Cañas et al., 2014), pero apenas se ha estudiado la arquitectura genética de esta persistencia.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar el patrón de la persistencia de fase entre las poblaciones de vacuno de carne españolas a lo largo de los autosomas bovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un genotipado de SNP de alta densidad mediante el BovineHD BeadChip (Illumina Inc, USA) a un total de 171 tríos de padre/madre/hijo pertenecientes a 7 poblaciones españolas de vacuno de carne, que incluían las razas Asturiana de los Valles (AV, n=25), Avileña-Negra Ibérica (ANI, n=24), Bruna dels Pirineus (BP, n=25), Morucha (Mo, n=25), Pirenaica (Pi, n=24), Retinta (Re, n=24) y Rubia Gallega (RG, n=24). Los progenitores fueron seleccionados con la menor relación de parentesco entre si. Los SNP que se utilizaron en el presente estudio pertenecen a los cromosomas autosómicos y no están en posiciones repetidas. Los requisitos adicionales fueron: una probabilidad de equilibrio de Hardy-Weinberg menor de 0,05, una tasa de genotipado ("call rate") entre SNP e individuos superior a 0,95 y una frecuencia del alelo menos frecuente (MAF) inferior a 0,01. El control de calidad se realizó mediante el software PLINK (Purcell et al., 2007), quedando 706.704 SNP, a lo largo de las 2.510.606 kb, con un marcador por cada 3.553 kb de promedio. Los haplotipos parentales se establecieron mediante el software Beagle (Browning y Browning, 2009).

A partir de los haplotipos parentales, se tomaron las poblaciones por pares y se separaron los marcadores que segregaban en ambas poblaciones con una MAF de 0,05. Para cada población se definieron ventanas de 1 Mb a lo largo del genoma y se calculó el desequilibrio de ligamiento entre todos los marcadores de cada ventana como

$$r = \frac{D}{\sqrt{p_i q_i p_j q_j}},$$

donde $D = f_{11}f_{22} - f_{12}f_{21}$ (Falconer y Mackay, 1996). En promedio, el número de marcadores utilizados en cada ventana osciló entre 201 (Pi-Re) y 215 (AV-BP), con desviaciones típicas de en torno a 60.

La persistencia del desequilibrio de ligamiento entre 2 poblaciones se calculó a partir de la correlación entre los valores de DL de cada ventana para cada pareja de marcadores SNP en cada una de las poblaciones.

Una vez obtenidos los valores de persistencia para todo el genoma y para todos los pares de poblaciones, se calculó la media y la desviación típica de estos valores y se seleccionaron las zonas con valores mayores que la media más 3 desviaciones típicas. Posteriormente, se utilizó www.biomart.org y se identificaron los genes localizados en las zonas seleccionadas y las principales rutas biológicas en las que participan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de persistencia entre poblaciones (Tabla 1) y oscilaron entre 0,127 (Mo-Pi) y 0,999 (ANI-BP y BP-RG). Este resultado confirma la relación genética entre las poblaciones (Cañas et al., 2014). Pese a todo, se observó una importante heterogeneidad en la persistencia. Como ejemplo, en la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos en el cromosoma 7. Como se puede observar, en este cromosoma hay dos regiones que presentan una alta persistencia (Mb 11 y 54), mientras que en otras zonas apenas se observa. Un aspecto a destacar es que los resultados de persistencia son muy consistentes entre poblaciones. Este hecho nos hace sospechar que ésto debe ser atribuido a la presencia de genes o regiones genómicas de especial relevancia, cuya estructura se mantiene evolutivamente en mayor medida que en otras regiones.

A lo largo del genoma autosómico, se detectaron 42 regiones que presentaron valores por encima del 99,9% de la distribución empírica. Entre ellas, 10 regiones fueron detectadas en, al menos, 10 pares de poblaciones (Tabla 2). En esta tabla también se muestran los genes localizados en cada región.

La búsqueda en las bases de datos genómicos (www.biomart.org) de estas regiones localizó en torno a 220 genes distintos. Un análisis de enriquecimiento mediante el software Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) identificó las siguientes categorías GO: Procesos biológicos (*cell adhesion*), funciones moleculares (*translation repressor activity*) y componentes celulares (*connexon complex*). Este resultado confirma la presencia de genes fundamentales en las regiones asociadas con una mayor persistencia de fase.

En futuros estudios se pretende estudiar la posibilidad de ponderar las regiones del genoma en función de la persistencia entre poblaciones en los procedimientos de evaluación genómica con varias razas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Browning, B. L. & Browning, S. R. 2009. *Am. J. Hum. Genet.* 84(2):210-223.
- Cañas-Alvarez, J. J., González-Rodríguez, A., Munilla, S. 2014. 10th WCGALP
- Cañas-Alvarez, J. J., Mouresan, E. F., Varona, L., et al. 2014. 10th WCGALP
- Falconer & Mackay. 1996 4th edn. Longman Group UK, Harlow, England
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., et al. 2009. *J. Dairy Sci.* 92:433-443.
- Kachman, S. D., Spangler, M. L., Bennett, G.L., et al. 2013. *Genet Sel Evol* 45:30
- Meuwissen, T. H. E., Hayes, B. J., Goddard, M. E. 2001. *Genetics* 157:1819-1829.
- Mouresan, E. F., Munilla, S., Diaz, C., et al. 2014. 10th WCGALP.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K. et al. 2007. *Am. J. Hum. Genet.* 81:559-575.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido posible gracias al soporte económico del proyecto AGL2010-15903. Aldemar González-Rodríguez y Jhon Jacobo Cañas-Álvarez agradecen el apoyo financiero aportado por la beca universitaria BES-2011-045434 y la beca de COLCIENCIAS Francisco José de Caldas 497/2009.

Tabla 1. Valor medio, s.d y valores mínimos y máximos de r en todos los pares de poblaciones.

	Pares de poblaciones	Medio (s.d) r	Min – Max r
1	AV - ANI	0,576 (0,120)	0,239 – 0,989
2	AV - BP	0,632 (0,110)	0,293 – 0,990
3	AV - Mo	0,596 (0,116)	0,266 – 0,987
4	AV - Pi	0,562 (0,122)	0,169 – 0,994
5	AV - Re	0,565 (0,121)	0,228 – 0,979
6	AV - RG	0,592 (0,122)	0,223 – 0,992
7	ANI - BP	0,522 (0,125)	0,162 – 0,999
8	ANI - Mo	0,621 (0,118)	0,227 – 0,998
9	ANI - Pi	0,489 (0,131)	0,140 – 0,992
10	ANI - Re	0,566 (0,127)	0,204 – 0,991
11	ANI - RG	0,525 (0,130)	0,194 – 0,994
12	BP - Mo	0,538 (0,120)	0,209 – 0,989
13	BP - Pi	0,579 (0,127)	0,227 – 0,997

14	BP - Re	0,511 (0,123)	0,192 – 0,994
15	BP - RG	0,572 (0,126)	0,186 – 0,999
16	Mo - Pi	0,507 (0,127)	0,127 – 0,983
17	Mo - Re	0,574 (0,123)	0,215 – 0,986
18	Mo - RG	0,544 (0,126)	0,224 – 0,994
19	Pi - Re	0,480 (0,130)	0,155 – 0,998
20	Pi - RG	0,520 (0,133)	0,189 – 0,996
21	Re - RG	0,515 (0,131)	0,151 – 0,994

Tabla 2. Cromosoma y posición de las zonas con valores de r mayores que el 99,9% que aparecen más frecuentemente, y los genes encontrados en estas zonas.

Cromosoma	Mb	Genes
7	11, 54	Olfactory receptor, <i>CYSTM1</i> , <i>PCDHA5</i> , (y 27 genes más)
10	105	<i>EIF3J</i> , <i>SPG11</i> , <i>U6</i> , <i>U5</i> , <i>PATL2</i> , <i>B2M</i> , <i>TRIM69</i>
12	42, 92	<i>RPL22</i> , <i>CDC16</i> , bta-mir-2303, <i>UPF3A</i> , <i>CHAMP1</i>
15	1, 86	<i>OR9G1</i> , <i>GLB1L2</i> , <i>B3GAT1</i>
16	8	-
17	76	<i>DGCR8</i> , <i>TRMT2A</i> , <i>RANBP1</i> , <i>SNORA77</i> , <i>ZDHHC8</i>
23	1	<i>KHDRBS2</i>

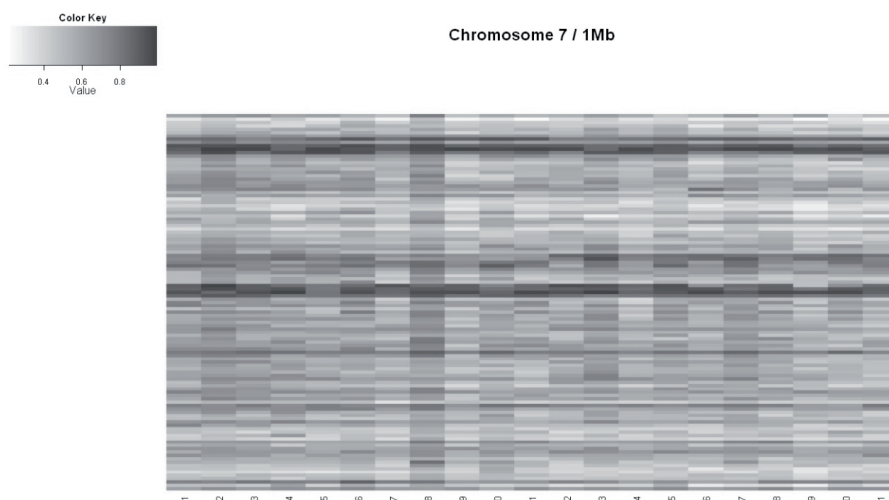


Figura 1. Heatmap de los valores de r por Mb del cromosoma 7 de todos los pares de poblaciones.

REGIONS WITH HIGH PERSISTENCY OF LINKAGE DISEQUILIBRIUM IN SEVEN SPANISH BEEF CATTLE POPULATIONS

ABSTRACT: This study analyzed the persistency of the linkage disequilibrium between 7 Spanish beef cattle populations. The persistency was calculated as the correlation between the LD values of the SNPs of regions of 1 Mb each, between two populations. The results yielded positive values in all cases of comparison and regions. The persistency values of 42 regions were found to be higher than the 99.9% of the empirical distribution and 10 of those regions were found to be consistent in more than 10 of the 21 comparison cases. These 42 regions were found to accommodate around 220 genes associated with biological processes (*cell adhesion*), molecular functions (*translation repressor activity*) and cell components (*connexon complex*).

Keywords: Linkage disequilibrium, beef cattle, persistency

EVOLUCIÓN DE LA IMPORTANCIA ECONÓMICA DE CARACTERES CONSIDERADOS EN EL OBJETIVO DE SELECCIÓN DE LA RAZA FRISONA ESPAÑOLA

Pérez-Cabal, M.A.¹ y Charfeddine, N.²

¹Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
Avda. Puerta de Hierro, s/n 28040 Madrid. mapcabal@vet.ucm.es

²Dpto. Técnico CONAFE.
Ctra. de Andalucía, Km. 23,6. 28340 Madrid

INTRODUCCIÓN

El programa de mejora genética de la raza frisona española busca maximizar los beneficios de sus ganaderos mediante el incremento de la eficiencia productiva de sus animales. En 10 años (2000-2011) se consiguió un aumento anual medio de producción de leche de 85, 112 y 130 kg para vacas de primer, segundo y tercer parto, respectivamente, lo que representó un progreso genético medio continuo de 65 kg cada año (Charfeddine, 2014). Sin embargo, la funcionalidad de las vacas ha ido empeorando como consecuencia de las correlaciones negativas entre producción y los caracteres funcionales, por lo que en el objetivo de selección se han ido incluyendo caracteres como la fertilidad y la salud de los animales. Una de las primeras tareas para definir un nuevo índice de selección (ICO) que permita ordenar los animales de acuerdo al objetivo de selección es definir la importancia económica de cada carácter en un determinado escenario económico. El ICO actual se estableció en 2010 y está previsto actualizarlo para aplicarlo en la evaluación de junio de 2015, por lo que el objetivo de este trabajo es presentar los cambios en los pesos económicos estimados en la situación base y los escenarios previstos para los periodos 2010-2014 y 2015-2019 que se utilizaron para definir el ICO-2010 y el ICO-2015.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos económicos de los años 2008 y 2013 se recogieron mediante una encuesta realizada a las asociaciones y federaciones autonómicas. Los datos se ponderaron en función del número de vacas en cada autonomía para identificar la situación económica media de la ganadería frisona española en los escenarios base correspondiente a esos dos años. En la actualización del ICO-2010 se contó con la información proporcionada por 10 comunidades autónomas (Charfeddine, 2009) mientras que en la actualización del ICO-2015 fueron 8 las comunidades que aportaron información (Charfeddine y Pérez-Cabal, 2014). Los datos productivos para definir los escenarios base se han obtenido a partir de la información del control lechero. Para determinar la producción de leche y la edad al primer parto en el escenario 2008, se utilizaron las vacas que hubieran parido entre julio de 2006 y junio de 2007, y por tanto hubieran finalizado la lactación durante 2008, y para el escenario 2013 se utilizaron lactaciones que finalizaron durante 2013. En la Tabla 1 se muestra la información utilizada para definir la situación base de las dos actualizaciones del ICO. Para calcular el beneficio se consideraron como ingresos la venta de leche, principalmente, así como la venta de terneros y vacas de desvieje. Los costes incluidos correspondieron a alimentación, inseminaciones, medicinas y veterinario, ordeño y mano de obra. El peso económico de un carácter se calculó como el cambio en el beneficio debido al incremento en una unidad del mérito genético de ese carácter y no se tuvo en cuenta la cuota lechera. Para definir la situación prevista durante el periodo de 5 años durante el cual se aplicará el ICO, se estableció el escenario más probable modificando principalmente el precio de la leche y el coste de alimentación, que son los dos parámetros más variables y que más afectan a los pesos económicos de los caracteres estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si se compara la previsión para aplicar el ICO-2010 y la situación base del ICO-2015, para la que se han utilizado los precios de 2013, se observa una subestimación en el beneficio marginal esperado por kilos de leche, grasa y días abiertos. Aunque el precio de la leche en 2013 bajó respecto a 2008 y los costes de alimentación y recría aumentaron, el peso económico de los kilos de leche es ligeramente superior en la situación base del ICO-2015

que en la del ICO-2010 (0,12 €/kg frente a 0,09 €/kg por vaca y año) porque las bonificaciones/penalizaciones por componentes han bajado ligeramente. Sin embargo, el peso económico de fertilidad y mastitis es menor frente a lo previsto debido a un aumento en el intervalo entre partos y la incidencia de mastitis (Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros productivos y económicos medios en 2008 y 2013 considerados para definir la situación base correspondiente a las actualizaciones del ICO en 2010 y 2015, respectivamente.

	2008	2013
Edad al primer parto (meses)	26,4	27,1
Intervalo entre partos (días)	422	424
Nº partos/vaca	3,26	2,91
Nº inseminaciones/vaca	2,72	2,69
Incidencia de mastitis (número de casos/vaca/año)	0,33	0,60
Kg leche a 305 días	8.763	9.542
% grasa	3,56	3,65
% proteína	3,17	3,20
Precio base de leche (€/kg)	0,37	0,36
Prima/penalización % grasa (€/décima/kg leche)	0,0024	0,0023
Prima/penalización % proteína (€/décima/kg leche)	0,0044	0,0041
Costes de Alimentación (€/UFL)	0,26	0,28
Gastos de recría (€/novilla)	1.572	1.685

Tabla 2. Pesos económicos de los distintos caracteres en la situación base y los escenarios previstos para los periodos de aplicación del ICO-2010 y el ICO-2015.

	ICO-2010		ICO-2015	
	Situación Base	Escenario 2010-2014	Situación Base	Escenario 2015-2019
Kg. leche (€/kg/vaca/año)	0,09	0,09	0,12	0,10
Kg. grasa (€/kg/vaca/año)	0,86	0,25	0,66	0,44
Kg. proteína (€/kg/vaca/año)	3,65	3,59	3,10	2,99
Longevidad (€/día/vaca/año)	0,18	0,20	0,17	0,20
Días abiertos (€/día/vaca/año)	-1,96	-1,44	-1,89	-1,58
Rec. cél. somáticas (€/vaca/año)	-	-	-18,74	-20,62
Mastitis (€/caso/vaca/año)	-115,81	-114,48	-104,56	-108,74
Velocidad de ordeño (€/vaca/año)	-	-	-33,12	-36,43

La importancia relativa de los caracteres se expresa como peso económico relativo, utilizando el peso económico de los kilos de proteína como referencia. En la situación prevista para los próximos 5 años con el nuevo ICO-2015 (Tabla 3), se observa que el carácter de mayor importancia económica relativa son los kilos de leche, siendo un 16% más que los kilos de proteína, seguido de la longevidad. Seleccionar sólo por días abiertos generaría el 38% del beneficio generado por proteína (con signo negativo, porque habría que seleccionar para reducir los días abiertos). Los kilos de grasa y el recuento celular tendrían casi la misma importancia entre sí, y la mastitis y la velocidad de ordeño serían los de menor peso relativo. Si se comparan estos valores con los del ICO-2010 se observa que los kilos de leche son más importantes que los kilos de proteína debido en primer lugar al sistema de pago de la leche, porque no se ha pagado la proteína como estaba previsto, y en segundo lugar, porque han aumentado los costes de alimentación dado que las necesidades energéticas para producir proteína son más altas. La importancia de la longevidad aumenta un 14% debido a que la vida productiva de las vacas se ha reducido y, por lo tanto, los costes de recría se amortizan en menos tiempo siendo además más altos por al incremento en los costes de alimentación. La importancia de los días abiertos se ha reducido en un 47%

frente a la situación anterior debido a la reducción en el beneficio marginal por producir leche.

Tabla 3. Pesos económicos relativos referidos al peso económico de kg de proteína de los distintos caracteres en los escenarios económicos previstos para los periodos de aplicación del ICO-2010 y el ICO-2015 (2010-2014 y 2015-2019, respectivamente).

Peso económico relativo (%)	ICO-2010	ICO-2015
Kg. leche	80	116
Kg. grasa	8	19
Kg. proteína	100	100
Longevidad	56	64
Días abiertos	-56	-38
Recuento células somáticas	-	-17
Mastitis	-10	-11
Velocidad de ordeño	-	-11

Comparando los pesos relativos de los caracteres productivos entre sí tanto en ICO-2010 como en ICO-2015 se observa un incremento en la importancia de producir volumen de leche (sin componentes) dado que cada vez se paga menos por grasa y por proteína mientras que el coste de alimentación aumenta. Los pesos relativos de los caracteres funcionales frente a los productivos en el ICO-2015 ganan mayor importancia pues cada vez se paga menos por la leche y los costes aumentan.

En estas circunstancias, los caracteres de mayor importancia económica relativa son, por este orden, los kilos de leche, kilos de proteína, longevidad y fertilidad. Sin embargo, a la hora de definir los pesos relativos dentro del ICO hay que tener en cuenta las correlaciones genéticas entre los diferentes caracteres, por lo que en el nuevo ICO-2015 se incluyen también otros caracteres que eviten un deterioro de la funcionalidad, como el recuento celular y caracteres morfológicos de ubres y patas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Charfeddine, N. 2009. Frisona española 173, 54-56.
- Charfeddine, N. 2014. Frisona española 203, 64-66.
- Charfeddine, N. & Pérez-Cabal, M.A. 2014. Frisona española 204, 36-39.

Agradecimientos: Los autores agradecen a CONAFE la financiación (convenio 4155319 UCM-CONAFE), así como a los secretarios ejecutivos de las asociaciones y federaciones autonómicas de frisona española, a Antonio Seguí del portal, Remugants.cat y a la Sociedad Cooperativa Gallega SERAGRO, por colaborar en la recogida de la información.

EVOLUTION OF THE ECONOMIC IMPORTANCE OF TRAITS INVOLVED IN THE BREEDING GOAL OF SPANISH HOLSTEIN-FRIESIAN COWS

ABSTRACT: The economic weights estimated for the base situation and the expected scenario of five-year following period for the ICO-2010 and the next ICO-2015 have been compared. Economic weights used for each ICO were based on the economic and productive parameters in 2008 and 2013, respectively. Given the payment system of milk in Spain, where quality in terms of percentage of fat and milk is not as valued as in other countries, the most economically important traits for the next 5 years will be milk volume, protein yield, longevity, and fertility. Moreover, in the selection index other traits such as somatic cell count and type traits related to udder and feet and legs must be taken into account in order to improve animal functionality.

Keywords: economic weight, functionality, productivity, dairy cow

ESTUDIO DE LA PRECISIÓN REALIZADA OBTENIDA EN LOS DOS AÑOS DE EVALUACIONES GENÓMICAS EN EL VACUNO LECHERO ESPAÑOL

Jiménez-Montero, J.A.¹, Charfedinne, N.¹ y González-Recio, O.^{2,3}

¹ CONAFE - Confederación de Asociaciones de Frisona Española

² INIA – Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias

³ Department of Environment and Primary Industries (Australia)

Ctra. de Andalucía, km. 23,600 - 28340 Valdemoro (Madrid).

Joseantonio.jimenez@conafe.com

INTRODUCCIÓN

La selección genómica (SG) en vacuno de leche ha supuesto un gran avance en la precisión con la que se predicen los valores genéticos. Las primeras evaluaciones genómicas oficiales españolas se publicaron en Noviembre de 2012 empleando la población de referencia (PR) del consorcio Eurogenomics. La selección de terneros por parte de los centros de inseminación artificial se basa desde entonces en estas predicciones genómicas. Esto supone que los terneros candidatos a sementales proporcionan un mayor salto en el progreso genético de la población. La mayor fiabilidad genera la confianza suficiente como para que el ganadero esté dispuesto a pagar un precio mayor por terneros testados genómicamente. Aunque aún hay una corriente conservadora que prefiere seguir usando toros con prueba de progenie.

Con SG es además posible obtener evaluaciones de hembras con una fiabilidad que previamente sólo era alcanzada por vacas con muchos partos, y por tanto demasiado tarde en la vida del animal como para tomar decisiones de selección. Ahora esta fiabilidad se alcanza antes de la primera cubrición de las novillas (Jiménez-Montero y García-García, 2014). En la actualidad, la mayoría de estas pruebas genómicas se realizan con el chip diseñado específicamente para la población de EUROGENOMICS denominado EuroG10K, que incluye una región privada española modificable año a año donde se pueden incluir SNPs de interés para estudios de investigación en vacuno de leche y carne. En el diseño de actual han intervenido junto a CONAFE el laboratorio Xenetica Fontao, Neiker, la UCM y la UNIZAR dotando al chip de marcadores de interés para distintos propósitos.

En este trabajo comparamos las primeras evaluaciones genómicas en España con las pruebas de descendencia de esos toros que en el 2012 eran toros genómicos. El objetivo es determinar empíricamente la precisión de las primeras evaluaciones genómicas españolas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron valores genómicos de 214 terneros calculados en las pruebas de Noviembre de 2012 con el método Random Boosting (González-Recio et al., 2013). Posteriormente estos valores genómicos directos se combinaron con las pruebas tradicionales para obtener los valores genómicos oficiales. Estas predicciones se compararon con las evaluaciones oficiales de Noviembre de 2014, que fueron realizadas utilizando el método BLUP de prueba de descendencia. Se usaron sólo aquellos toros sin datos de progenie en 2012 y con al menos 20 hijas en producción y tipo en 2014.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la precisión realizada (correlación de Pearson) del índice de pedigrí y de las pruebas genómicas oficiales de Noviembre de 2012, comparadas con las pruebas de progenie de Noviembre de 2014. La prueba genómica fue más precisa para los 12 caracteres analizados, con un incremento medio del 42% en la precisión. En el caso del porcentaje de grasa, el incremento fue más del doble, mientras que el menor incremento se observó para fertilidad, con un 6%. El índice ICO, que combina caracteres de producción, tipo y funcionales, es un 29% más preciso si se usa información genómica (0,68 vs 0,53).

La Figura 2 muestra un gráfico de puntos comparando la prueba genómica combinada del 2012, con la prueba de progenie de 2014. La prueba genómica predice la prueba de progenie futura con una menor diferencia con la prueba de progenie que el índice de pedigrí. Un 42% de las pruebas genómica para el ICO tuvo una diferencia de menos de 200 puntos mientras que el índice de pedigrí un 39% de pruebas variaron en menos de 200 puntos. Un 34% de las pruebas de índice de pedigrí variaron en más de 400 puntos, y de éstas, un 35% lo hizo en más de 600 puntos. La prueba genómica se separó en más de 400 puntos sólo

para el 25%, Y sólo un 6% sobre el total varió más de 600 puntos. Mantener el control de rendimientos permite detectar estas desviaciones e incorporar estos toros con nueva información a la PR para futuras evaluaciones. Hay que destacar que estos errores de predicción tuvieron signo positivo o negativo de manera independiente al valor genómico predicho en 2012. No se observa por tanto una sobreestimación sistemática del valor de estos animales siendo el coeficiente de regresión para este grupo de animales de 0.99.

Teniendo en cuenta estos resultados, y asumiendo una reducción del intervalo generacional en la línea padre-hijo de 4 a 3 años y manteniendo el intervalo generacional de la línea madre-hija constante, es posible calcular el incremento en progreso genético en puntos de ICO. En la línea hembra, el progreso genético en ICO utilizando SG aumentaría en un 28%, mientras que en la línea macho, el progreso genético puede aumentar hasta un 71%. El progreso genético en ICO de los toros españoles entre los años 2000 y 2012, antes de la SG, fue de 62 puntos de ICO por año. Con SG, el progreso genético habría sido de 45 puntos más de ICO al año (107) en toros, y de 17 puntos más al año (79) en hembras.

En la figura 3 se muestra el incremento en el uso de toros jóvenes, tradicionalmente el toro en prueba suponía un 30% del total, con la llegada de la genómica estos toros se han convertido en un nuevo producto que está ganando cuota de mercado.

En conclusión, las evaluaciones genómicas implementadas en 2012 en el ganado Holstein español han resultado muy superiores en precisión y fiabilidad a lo ofrecido anteriormente por el índice de pedigrí. Además, el progreso genético en el objetivo de selección se ha incrementado en un 72 y un 28% en las líneas padre-hijo y madre-hija, respectivamente. Es conveniente seguir trabajando para incrementar aún más la fiabilidad de las pruebas genómicas utilizando métodos y procedimientos más precisos, así como en la implementación más efectiva de la SG en las granjas comerciales

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Charfeddine, N., Rodríguez-Ramilo, S.T., Jiménez-Montero, J.A., Carabaño, M.J., & González-Recio, O. 2013. Non parametric vs. GBLUP model for genomic evaluation with large reference population in Holstein cattle. Interbull Bull. 47.
- González-Recio, O., Jiménez-Montero, J.A., & Alenda, R. 2013. The gradient boosting algorithm and random boosting for genome-assisted evaluation in large data sets. J. Dairy Sci. 96:614-624.
- Jiménez-Montero, J.A., García-García, M.E., 2014. La revolución genómica en la mejora genética animal. Su implementación en el vacuno lechero. Ed. Agrícola. P. 54

Agradecimientos: ABEREKIN, ASCOL, XENETICA FONTAO, GENETICAL y MAGRAMA por su colaboración en la puesta en marcha de las evaluaciones genómicas nacionales.

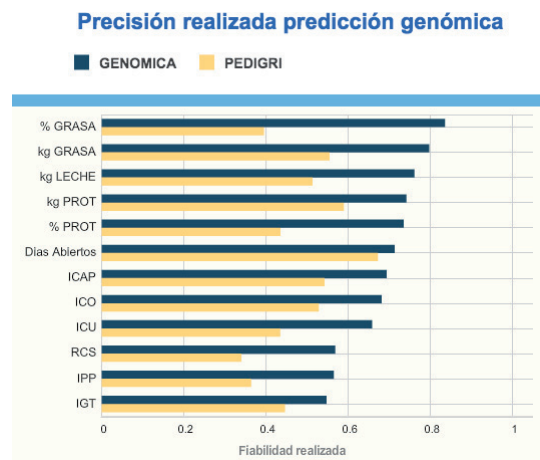


Figura 1. Fiabilidades realizadas de las pruebas genómicas oficiales de Noviembre de 2012 para los caracteres más importantes en el vacuno lechero español.

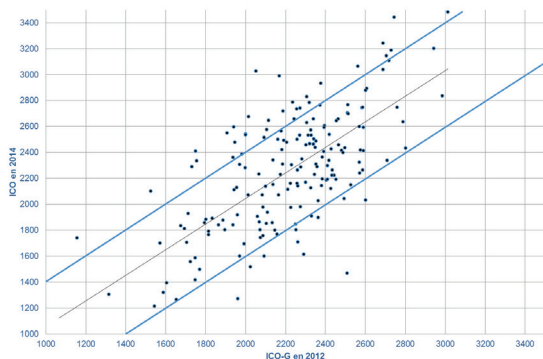


Figura 2. Gráfico de puntos y recta de regresión entre los valores genómicos combinados de 177 toros sin hijas en Noviembre 2012 y con al menos 20 hijas con dato en producción y tipo en Noviembre de 2014

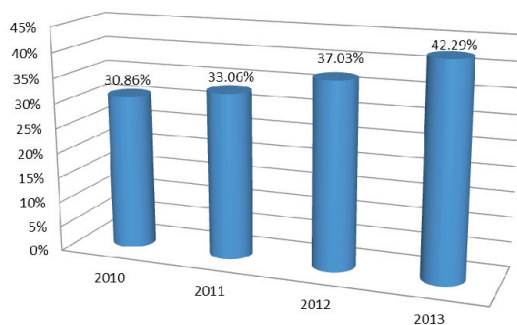


Figura 3. Uso de toros en España con edad inferior a 24 meses respecto al total

STUDY ON THE REALIZED ACCURACY OBTAINED DURING THE TWO YEARS OF GENOMIC EVALUATIONS IN THE SPANISH DAIRY CATTLE

ABSTRACT: Genomic-assisted evaluations were first officially implemented in the Spanish dairy cattle in November 2012. Those genomic bulls are now progeny tested. Here, we evaluated the realized reliability of the first genomic evaluations by comparing the genomic predictions with the progeny proof. The genomic proofs were more accurate than the pedigree index for the 12 analysed traits. The genomic proofs were, in average, 42% more accurate than the pedigree index. For the total merit index (ICO), the genomic proof was 29% more accurate compared to the pedigree index. Bias was also smaller with the genomic proofs, with prediction closer to the ‘a posteriori’ observed progeny proofs. Almost half of the genomic predictions (42%) differed in less than 200 points of ICO from the posterior progeny proof, compared to the 39% for pedigree index. Further, 12% of the pedigree indices varied in more than 600 points of ICO compared to the progeny proof, whereas only 6% of the genomic proofs had such a large prediction bias. The genetic progress for the total merit index (ICO) increased between 28 and 71 % for the dam-cow and sire-bull paths.

Keywords: Genomic selection, genomic evaluations, realized reliability.

IMPACTO ECONÓMICO DE LA MEJORA DE LA PRODUCTIVIDAD EN LA RENTABILIDAD DEL SECTOR VACUNO DE CARNE EN ESPAÑA

López-Paredes, J.¹. y Alenda, R.¹.

¹Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, UPM. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid.

javier.lopez.paredes.21@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Según el MAGRAMA (2014) los resultados productivos del sector vacuno de carne español muestran una baja fertilidad y una elevada edad al primer parto para un total de 1.873.147 nodrizas (SITRAN, 2014). El número de terneros registrados por vaca y año se sitúa en 0,68 y el primer parto en más de 3 años de edad para el 44 % de los primeros partos registrados. Esta improductividad tiene una notable importancia en la economía de las explotaciones actuales.

El objetivo de este trabajo es cuantificar la pérdida económica que supone para el sector vacuno de carne esta situación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se basa en los datos medios publicados sobre fertilidad por el MAGRAMA (2014). Se analiza la mejora que se produciría ante un aumento de la fertilidad expuesta en los datos del MAGRAMA (2014), para una vaca tipo de 600 kg de peso vivo y una producción de leche media de 6 litros/día. Los terneros son destetados a los 6 meses de edad con un peso medio de 200 kg de peso vivo. Se ha considerado una mortalidad desde el parto al registro del ternero de 0,04 terneros muertos por parto y no se ha considerado mortalidad desde el registro del ternero al destete.

La metodología a emplear es la caracterización del sistema de producción mediante un modelo matemático, basado en el propuesto por Harris (1970). Según el cual, se desarrolla una ecuación que caracteriza el sistema de producción, en función de aquellos caracteres que son susceptibles de mejora por cualquier disciplina de la producción animal (Dickerson, 1970). El objetivo de este modelo matemático es determinar aquellas situaciones o animales que se maximiza la relación entre ingresos y costes generados, eficiencia (Dickerson, 1970.; Tess y Davis, 2002).

La *Rentabilidad* de una explotación se expresa como:

$$\text{Rentabilidad} = N \times P \times (\text{Ingresos} - \text{Coste de producción})$$

Donde *Rentabilidad* es €/año, *N* es el número de nodrizas, *P* es número de terneros comercializados/vaca/año, *Ingresos* por ternero comercializado al destete y *Coste de Producción* es coste de suplementación de la nodriza (*CN*) y su reposición (*CR*), expresados en €/ternero comercializado (€/TC).

La Productividad (*P*) se calcula como:

$$P = (Tr - R) \times (s)$$

Donde *Tr* es el número terneros registrados/vaca/año (*Tr* se calcula en función del número de partos por vaca y año y la mortalidad de los terneros hasta el registro) menos el número *R* el nº de terneras destinadas a reposición por vaca y año y *s* la supervivencia desde registro al destete.

La reposición (*R*) se calcula como la inversa del número de terneros registrados por vaca (*n*) multiplicada por los terneros registrados por vaca y año (*Tr*).

$$R = (1/n) \times Tr$$

n depende de la edad último parto (*D*), la edad al primer parto (*Epp*), el intervalo entre partos (*Ipp*) y la mortalidad hasta el registro (*m*).

$$n = ((D - Epp) / Ipp) + 1 \times (1 - m)$$

Los *Ingresos* corresponden a un ternero comercializado al destete (2,3* €/kg PV; *media entre machos y hembras).

El *Coste de Producción* es el coste de suplementación de la nodriza (CN) y su reposición (CR) expresado en €/ternero comercializado. Se calcula como el coste por nodriza y año dividido entre la productividad (P).

$$\text{Coste Producción} = (\text{CN} + \text{CR}) / \text{P}$$

CN depende del peso vivo (NE_1 , necesidades energéticas*), las disponibilidades forrajeras (DF), el período entre dos partos (lpp) y el precio de suplementación (psup). Para calcular el coste medio anual, multiplicamos por Tr.

$$\text{CN} = (\text{lpp} \times (\text{NE}_1 - \text{DF})) \times \text{psup} \times \text{Tr}$$

CR depende de la reposición (R), peso vivo (NE_2 , necesidades energéticas novilla*), el número de lotes de novillas (b) y el precio de suplementación (psup=).

$$\text{CR} = \text{R} \times (\text{NE}_2) \times \text{b} \times \text{psup}$$

b depende de la edad al primer parto (Epp) y la edad al destete (Ed).

$$\text{b} = (\text{Epp} - \text{Ed}) / 365$$

Se estima un coste de producción medio de 414 €/TC suponiendo un precio de 0,22 €/UFL (López-Paredes, 2013). * NE_1 y NE_2 calculadas según A'Gabriel y D'Hour (2007).

De esta forma los dos factores Epp e lpp inciden en el aumento o disminución de la productividad y de los costes de producción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los datos de edad al primer parto y de número de terneros registrados por vaca y año (MAGRAMA, 2014) y la estimación de intervalo entre partos, mortalidad de los terneros hasta el registro (se ha considerado una mortalidad de 0,04 terneros muertos por parto, desde el nacimiento hasta el registro), reposición, número de lotes de novillas y productividad para la situación actual y el objetivo alcanzable (24 meses de Epp y 365 días de lpp).

Tabla 1. Edad al primer parto (Epp), Intervalo entre partos (lpp), Mortalidad de los terneros hasta el registro (M, terneros muertos/terneros nacidos/año), Terneros registrados por vaca y año (Tr), Reposición (R, ternera reposición/vaca/año), número de lotes de novillas presentes en la explotación y Productividad (P, ternero comercializado/vaca/año).

	Epp	lpp	M	Tr	R	b	P
Situación 2014	36	514	0,04	0,68	0,12	2,5	0,56
Objetivo alcanzable	24	365	0,04	0,96	0,11	1,5	0,85

La mejora de los caracteres Epp e lpp supondría un aumento de 0,28 terneros registrados por vaca y año (Tr) y una disminución de las necesidades de reposición por vaca y año (R). Considerando una edad de último parto (D) de 10 años, la Reposición anual (R) disminuiría en 0,007 terneras destinadas a reposición por vaca y año y el número de lotes de novillas (b) disminuiría en 1 lote. La productividad aumentaría en 0,29 terneros comercializados por vaca y año. No se ha considerado la posible mejora producida por la disminución de la mortalidad desde el parto hasta el registro del ternero

La Tabla 2 muestra los resultados de ingresos, costes y margen en €/ternero comercializado y año, la eficiencia (ingresos/costes) y el número de terneros comercializados para los 1,8 millones de nodrizas y el margen obtenido en €/anuales para todo el sector.

Tabla 2. Ingresos y Costes (€/TC), Margen (€/TC) y Eficiencia (Ingresos/Costes) y Número de terneros comercializados al destete y Margen obtenido para la población de 1,8 millones de nodrizas en la situación actual y alcanzado el objetivo de fertilidad.

	Ingresos (€/TC)	Costes (€/TC)	Margen (€/TC)	Eficiencia	Número de terneros comercializados/año	Margen (€/año)
Situación actual	463	414	49	1,12	1.055.255	52.059.201
Objetivo alcanzable	462	298	164	1,55	1.590.094	262.365.460

Según estos datos para la población española de 1.873.147 nodrizas (SITRAN, 2014), el número de terneros comercializados al destete aumentaría en 534.839 terneros anuales (Tabla 2). Esto se debe principalmente a la disminución del lpp en 149 días, suponiendo un mayor número de partos anuales (542.994 partos) y a una disminución de la Epp en 1 año, lo que hace que disminuyan el número de terneras destinadas a reposición (13574 terneras para la situación actual).

Según los resultados, el Margen (Ingresos - Costes) podría aumentar en 210.306.259 € anuales para toda la población española de nodrizas si se alcanzase el objetivo de fertilidad. Esto es debido en primer lugar, a un aumento de los terneros comercializados. En segundo lugar, a un aumento del Margen por ternero comercializado, debido a una disminución de los costes de producción (115 €/TC). Produciéndose un aumento de los ingresos generados en proporción a los costes incurridos (Eficiencia) de 0,43 € de ingresos por cada € gastado por ternero comercializado, pasando de 1,12 a 1,55 (Tabla 2). Estos resultados expresan el potencial del sector y la necesidad de la mejora de la productividad como un objetivo prioritario.

Para alcanzar estos objetivos sería necesario establecer un control de rendimientos informatizado de las explotaciones de nodrizas, englobando al menos al 50 % de la población. La mejora de los resultados se conseguiría a través de un “benchmarking” a nivel de explotación y por vaca nodriza. Se identificarían las diversas limitaciones productivas, estableciendo la mejora en el manejo, sanidad, genética y nutrición.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Agabriel, J. & D’Hour, P. 2007. Alimentations des vaches allaitantes In: Quae, E. (Ed.), Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA, pp. 58-65. • Dickerson, G.E. 1970. Efficiency of animal production - molding the biological components. Journal Animal Science 30, 849-859. • Harris, D.L. 1970. Breeding for efficiency in livestock production: defining the economic objectives. Journal Animal Science 30, 860-865. • López-Paredes, J. 2013. TFC, Metodología para la determinación de los objetivos de selección en un programa de mejora genética. Universidad Politécnica de Madrid. Resultados en vías de publicación. • MAGRAMA. 2014. Estudio del sector español de vacas nodrizas 2014. SG Productos Ganaderos. • SITRAN, 2014. Estudio Del Sector Español De Vacas Nodrizas • Tess, M. W., & Davis, K. C. 2002. Gordon Dickerson: Defining economic efficiency of beef production. In Proc. Beef Improv. Fed. Conf. http://www.bifconference.com/bif2002/BIFsymposium_pdfs/Tess_02BIF.pdf Accessed Apr (Vol. 20, p. 2003).

Agradecimientos: Este trabajo se realiza en base a un proyecto integrado en ASOPROVAC.

ECONOMIC IMPACT OF THE LOW FERTILITY IN THE SPANISH BEEF CATTLE POPULATION.

ABSTRACT: The last published data of beef cattle fertility in Spain shows a poor fertility of the Spanish population (0.68 registered calf per cow and year). High first calving age, high calving interval and may be high calving mortality caused this value. This situation has a capital impact in the cattle sector economy. This study shows the possible improvement of the economic situation due to a decrease of the calving interval until 365 days and the decrease of first calving age until 2 year. The commercialized young animals could achieve an increment of 534.839 young animals per year at weaning, and the economic impact could be 210.306.259 € for the Spanish Beef Cattle Sector. These results determine the improvement of fertility as a priority for the sector.

Keywords: *beef cattle, fertility, productivity, profit function.*

CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR CALOR EN RUMIANTES DE APTITUD LECHERA. CORRELACIÓN ENTRE TOLERANCIA Y NIVEL PRODUCTIVO

Ramón^{1a}, M., Serradilla^b, JM., Díaz^c, C., Molina^b, A., Pérez-Guzmán^a, MD., Serrano^c, M., Sánchez-Rodríguez^d, M. y Carabaño^c, MJ.

^aCERSYRA; ^bMERAGEN-UCO; ^cINIA; ^dDpto. Producción Animal-UCO

¹CERSYRA. Av. Del Vino 10. 13.300. Valdepeñas, mramon@jccm.es

INTRODUCCIÓN

La obtención de animales más adaptados a las condiciones en las que producen, como medio para lograr una producción más eficiente y sostenible es un objetivo prioritario. Este objetivo gana importancia en el contexto actual de cambio climático, en el que se espera un incremento de la temperatura global en las próximas décadas. La selección de animales más resistentes a los efectos negativos del estrés por calor sobre su capacidad productiva y reproductiva se presenta, por tanto, como una herramienta útil para lograr animales más adaptados. Para ello, es necesario abordar el estudio de aquellos criterios que podrían resultar útiles para alcanzar dicho objetivo (Misztal, 1999; Carabaño et al., 2014; Piles et al., 2014). El presente trabajo presenta 3 posibles criterios de selección en tres poblaciones de rumiantes de aptitud lechera (Frisona, Manchega y Florida) y evalúa la idoneidad de cada uno de ellos para la selección de animales termo-tolerantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron datos climáticos y productivos de animales de razas Frisona (vacuno), Manchega (ovina) y Florida (caprina) para los años 2002 a 2012. Los datos climáticos de cada una de las ganaderías, tomados de un total de 718 estaciones meteorológicas, fueron proporcionados por la AEMET y por el Servicio Integral de Asesoramiento al Regante de Castilla-La Mancha (SIAR). Se dispuso de medidas diarias de temperaturas media (T_{med}), máxima (T_{max}) mínima y de humedades relativas media (HR), máxima y mínima (HR_{min}). Estos parámetros fueron utilizados para calcular un índice combinado de temperatura y humedad utilizado para analizar los datos de las poblaciones ovina y caprina (THI; Finocchiaro et al., 2005):

$$THI = T_{max} - ((0,55 \times (1 - HR_{min}/100)) \times (T - 14,4))$$

Para la población de vacuno Frisón se utilizó la temperatura media diaria. Los datos productivos consistentes en cantidades de leche, grasa y proteína del día de control, así como la información genealógica necesaria, fueron proporcionados por la Confederación de Asociaciones de Frisona Española (CONAFE), la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Manchega (AGRAMA) y la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Caprino de Raza Florida (ACRIFLOR). En total, se usaron datos de 280.958 controles de 29.914 vacas, 1.056.377 controles de 159.222 ovejas y 67.545 controles pertenecientes a 9.578 cabras. El modelo general usado para determinar el efecto de la temperatura sobre el nivel productivo de los animales fue el siguiente:

$$y = EFFS + \sum_{0-3} b_T Z_T + \sum_{0-3} a_T Z_T + \sum_{0-3} p_e Z_T + e$$

donde, y es el carácter (Kg de leche, grasa y proteína), $EFFS$ incluye diferentes efectos fijos según la especie: rebaño-año-estación, n^o parto-edad parto-estado de lactación en vacuno; rebaño-día de control, n^o parto-edad parto-estado lactación, corderos nacidos y tipo de ordeño en ovino; y rebaño-año-estación, n^o parto-edad parto, la covariable días en ordeño ligada al n^o parto-edad parto y frecuencia de ordeño en caprino; b_T son los coeficientes de regresión para la variable climática (T_{med} en vacuno, y THI en ovino y caprino); Z_T son las covariables de un polinomio de Legendre cúbico evaluado a temperatura/THI T , a_T y p_e son los coeficientes aditivo y de ambiente permanente de la regresión aleatoria para T , e es el efecto residual. Los análisis se realizaron con software propio (López-Romero et al., 2003) en vacuno y el GIBBS2F90 (Misztal et al., 2002) en ovino y caprino. Se corrieron un total de 50.000 iteraciones, descartándose las 10.000 primeras (burn-in). A partir de los resultados de este modelo, se propusieron los siguientes criterios de selección para animales tolerantes al estrés por calor (Carabaño et al., 2014; Piles et al., 2014):

1. **EBV-EC**: Valor genético (EBV) para zona de estrés por calor ($T^a=25^oC$; THI=25)

2. *EBV-Pendiente*: Pendiente del EBV en la zona de estrés por calor ($T^a > 24$; $THI > 22$)
3. *CP*: Componente principal 2 (*CP2*), 3 (*CP3*) y 4 (*CP4*) de la descomposición del vector de coeficientes de regresión aleatoria

Se calculó la correlación entre los valores individuales para cada uno de estos criterios y el valor genético estimado bajo una situación de confort ($T=18^{\circ}\text{C}$; $THI=15$), *EBV_CONF*, como una medida de la correlación entre el criterio usado para seleccionar animales termo-tolerantes y el nivel productivo de dichos animales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra las matrices de correlaciones entre los coeficientes de regresión aleatoria para la variable climática. En general, se observa una correlación negativa entre el nivel productivo (intercepto) y la componente lineal. A medida que aumenta la T^a por encima de un umbral, los animales comienzan a dedicar un mayor gasto energético a funciones relacionadas con la termorregulación, lo que se reflejaría en una reducción de la producción. En animales más productivos, con un mayor gasto energético dedicado a la producción, esta reducción sería aún mayor. Además, como consecuencia de esta correlación negativa, la selección hacia animales termo-tolerantes podría conducir a una disminución del nivel productivo de los animales. Por eso, se hace necesario identificar un criterio de selección que permita lograr animales más tolerantes a los efectos del calor sin pérdida del nivel productivo. En este trabajo se ha propuesto 3 criterios para la selección de animales termo-tolerantes: el valor genético para el carácter bajo estrés por calor (*EBV-EC*), la pendiente de caída del EBV en la zona de estrés por calor (*EBV-Pendiente*) y los componentes principales (*CP1*, *CP2*, *CP3* y *CP4*) obtenidos de la descomposición del vector de coeficientes de regresión aleatoria. De forma general, el *CP1* explicó del 76-96% de variabilidad total en vacas, del 45-58% en ovejas y del 54-64% en cabras. Este *CP1* estuvo muy correlacionado ($r \approx 1$) con el nivel productivo del animal, por lo que se descartó como criterio de selección. El porcentaje de varianza explicada para el resto de componentes fue: para *CP2* entre un 4-15% en vacas, 20-34% en ovejas y 25-30% en cabras; para *CP3* entre un 3-6% en vacas, 12-16% en ovejas y 7-12% en cabras; y para *CP4* entre un 2-4% en vacas, 7-9% en ovejas y 4-5% en cabras.

Tabla 1. Correlaciones entre los coeficientes de regresión aleatoria.

Raza		Leche (kg)			Grasa (kg)			Proteína (kg)		
		Int	Lin	Cuad	Int	Lin	Cuad	Int	Lin	Cuad
Frisona	Lin	-0,35			-0,31			-0,20		
	Cuad	-0,07	0,02		-0,04	-0,54		0,03	-0,21	
	Cub	0,09	-0,15	-0,30	-0,21	0,43	-0,30	-0,05	0,17	-0,17
Manchega	Lin	0,02			-0,33			-0,40		
	Cuad	0,33	0,68		0,60	-0,30		0,48	-0,23	
	Cub	-0,10	0,46	0,30	-0,02	0,29	-0,26	-0,22	0,40	-0,10
Florida	Lin	-0,18			-0,18			-0,22		
	Cuad	0,49	-0,55		-0,11	-0,69		0,00	-0,65	
	Cub	0,02	0,37	-0,57	-0,12	0,22	-0,45	0,04	0,43	-0,46

La Tabla 2 muestra los valores de correlación entre el *EBV-CONF* y cada uno de los criterios de selección propuestos. El *EBV-EC* mostró una alta correlación con el nivel productivo en todos los casos, no resultando adecuado como criterio de selección para termo-tolerancia. El *EBV-Pendiente* también presentó altas correlaciones con nivel productivo, excepto para el carácter leche en vacas ($r=-0,12$) y proteína ($r=-0,11$) en ovejas. En estos dos últimos casos, este criterio resultaría útil para seleccionar animales termo-tolerantes. Los componentes principales mostraron un comportamiento diferente según la especie. En el caso del vacuno de leche, el *CP2* para el carácter Kg de leche y los componentes *CP3* y *CP4* para los caracteres Kg de grasa y proteína mostraron una correlación próxima a 0 con el nivel productivo. Estos componentes resultarían útiles para la selección de animales termo-tolerantes, si bien el porcentaje de la varianza total explicado por cada uno de ellos fue bajo (4-6%). Para el ovino de leche, ningún criterio resultó útil para una selección de animales

termo-tolerantes independientemente de su nivel productivo. Únicamente la EBV-Pendiente para el carácter Kg de proteína fue útil, con una correlación con el nivel productivo del -0.11. La descomposición en componentes principales no sirvió como criterio de selección en ningún caso. Para finalizar, en caprino de leche los resultados fueron poco satisfactorios como en el caso del ovino, si bien en esta especie los CP2 y CP4 para el carácter Kg de leche mostraron una correlación próxima a cero con el nivel productivo, pudiendo usarse como criterios de selección para animales termotolerantes.

Tabla 2. Correlación entre el valor genético estimado (EBV) del carácter en situación de confort y los diferentes criterios de selección para termotolerancia propuestos.

Raza	Caracter	EBV-EC	EBV-Pendiente	CP2	CP3	CP4
Frisona	Leche	1,00	-0,12	-0,03	0,20	0,11
	Grasa	1,00	-0,63	-0,19	-0,03	-0,04
	Proteína	0,99	-0,22	-0,14	0,05	0,01
Manchega	Leche	0,81	-0,94	-0,95	0,83	0,46
	Grasa	0,79	-0,78	-0,46	0,38	-0,89
	Proteína	0,85	-0,11	-0,64	-0,25	0,65
Florida	Leche	0,78	0,43	-0,03	0,95	0,10
	Grasa	0,63	0,28	0,54	0,93	0,62
	Proteína	0,81	0,39	0,51	0,99	0,22

Por tanto, los resultados de este trabajo muestran una correlación entre el nivel productivo de los animales y su susceptibilidad/resistencia a los efectos del estrés por calor. Así, se espera que una selección hacia animales termo-tolerantes llevase asociada una disminución del potencial productivo de los animales. Con el objetivo de contrarrestar este descenso productivo, se propusieron 3 criterios de selección para mejorar o evitar el deterioro de la tolerancia al EC que no conlleven una respuesta negativa asociada en producción. Dichos criterios han resultado útiles en vacuno, algo menos en ovino y muy poco en caprino. De todos ellos, la pendiente de caída del valor genético en la zona de estrés por calor (EBV-Pendiente) y el CP2 han sido los que han resultado más adecuados para la selección de animales termo-tolerantes sin perjuicio del nivel productivo. Otras alternativas, como el desarrollo de índices de selección que contemplen el antagonismo entre producción y adaptación a las altas temperaturas deben ser exploradas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carabaño et al. 2014. J. Dairy Sci. 97:7889.
- Finocchiaro et al. 2005. J. Dairy Sci. 88:1855.
- López-Romero et al. 2003. J. Dairy Sci. 86:3374.
- Misztal 1999. J. Dairy Sci. 82:3.
- Misztal et al 2002. Proc. WCGALP, France.
- Piles et al. 2014. J. Anim. Sc.i 92:4306.

Agradecimientos: Agradecemos a las asociaciones CONAFE, AGRAMA y ACRIFLOR la cesión de los datos productivos y de genealogía, y a la AEMET y al SIAR la cesión de los datos climáticos.

SELECTION CRITERIA FOR HEAT-STRESS TOLERANCE IN DAIRY RUMINANT. CORRELATION BETWEEN TOLERANCE AND PRODUCTIVE LEVEL

ABSTRACT: Selection towards increasing tolerance to the effects of heat is presented as a tool of great interest to obtain more adapted animals to the environment in which they are reared. In this work, we examined the correlation between the production level of animal, measured as the EBV in absence of heat stress (EBV-CONF: $T^a=18^{\circ}\text{C}$; THI=15), and 3 selection criteria based on the EBV under heat stress (EBV-EC), the slope of decrease of EBV in the heat stress region (EBV-Pendiente: $T>24^{\circ}\text{C}$; THI > 22) and the principal components 2 to 4 obtained from the vector of random-regression coefficients. A moderate-to-high correlation between different criteria and the production level of animals were observed. Among all criteria considered, only the EBV-Pendiente for milk yield in cows and protein yield in ewes, the CP2 component in cows and ewes, and the CP4 component in the three breeds resulted useful as selection criteria towards more tolerant animals to heat.

Keywords: heat stress, selection criteria, dairy ruminants

OPTIMIZACIÓN DE LA CREACIÓN DE POBLACIONES BASE EN PROGRAMAS DE MEJORA EN ACUICULTURA

Fernández¹, J., Toro², M. A., Sonesson³, A. K. y Villanueva¹, B.

¹Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Madrid, Spain. ²Departamento de Producción Animal, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain.

³Nofima, Ås, Norway. jmj@inia.es

INTRODUCCIÓN

El éxito de un programa de mejora genética en acuicultura depende de la manera en que la población base ha sido construida (Holstmark et al., 2008), ya que la variabilidad genética que contengan los fundadores será aquella disponible en el proceso de selección. Tradicionalmente las poblaciones base se creaban a partir de diferentes poblaciones salvajes para las que no se tenía conocimiento ni de su estructura (diversidad genética entre y dentro de líneas) ni del nivel fenotípico para caracteres de interés. De esa manera la estrategia era tomar el mismo número de individuos de cada una de ellas. Sin embargo, para algunas especies existen actualmente líneas ya seleccionadas. En estos casos el valor fenotípico para caracteres de interés comercial puede usarse como criterio para decidir los fundadores con el objetivo de hacer el programa de mejora más competitivo desde un principio. Por otra parte, la creciente disponibilidad de paneles densos de SNP para especies acuícolas hace posible determinar la diversidad entre y dentro de poblaciones y tenerla en cuenta en el diseño de poblaciones base.

El objetivo de este trabajo fue estudiar, a través de simulación por ordenador, las consecuencias de usar información genómica para calcular las relaciones genéticas entre y dentro de líneas y registros fenotípicos en la optimización del muestreo de individuos cuando se crea la población base de un programa de mejora genética en acuicultura. Los resultados obtenidos en diversos escenarios se compararon en función del nivel fenotípico y la diversidad genética que presentaba la población base así como a lo largo del propio programa de selección artificial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estructura genómica: Se simularon individuos diploides con 20 cromosomas de 1 M cada uno. Cada cromosoma tenía 25.000 loci bialélicos neutros (no marcadores). Adicionalmente se incluyeron otros 5 – 5.000 SNP por cromosoma uniformemente distribuidos. Así el número total de marcadores oscilaba entre 100 y 100.000 en todo el genoma.

Generación de candidatos: Los individuos disponibles para crear la población base se generaron en dos etapas. Primero se mantuvo una población grande ($N = 1.000$) durante 1.000 generaciones bajo contribuciones y apareamiento aleatorio, permitiendo mutaciones para ambos tipos de loci a una tasa de $2,5 \times 10^{-3}$. Se creó así un patrón de desequilibrio de ligamiento (LD) entre loci marcadores y no marcadores. En una segunda etapa los individuos se asignaron aleatoriamente a 10 grupos (líneas). Se definió un carácter cuantitativo (objetivo de selección en el programa de mejora) de media, varianza fenotípica y heredabilidad de 100, 30 y 0,4, respectivamente, controlado por 1.000 loci aditivos elegidos al azar en el genoma. Las líneas se dejaron evolucionar independientemente durante 20 generaciones bajo tres esquemas: i) selección aleatoria; ii) selección artificial para simular líneas ya mejoradas; iii) selección estabilizadora con diferentes óptimos (líneas salvajes con diferentes adaptaciones locales). Las poblaciones resultantes (con 50 machos y 50 hembras cada una) se consideraron las líneas disponibles para crear la población base.

Fundación de la población base: De los 1.000 candidatos disponibles se seleccionaron 100 machos y 100 hembras siguiendo varias estrategias: i) tomar al azar el mismo número de individuos de cada línea (estrategia E); ii) proporciones óptimas de cada línea para maximizar la heterocigosidad esperada (He) calculada a partir de los valores medios de parentesco dentro y entre líneas (estrategia MC); iii) proporciones óptimas de cada línea para maximizar la media fenotípica con una restricción en parentesco (estrategia MP); iv)

como en ii) pero usando relaciones individuales (estrategia IC); v) como en iii) pero usando valores fenotípicos individuales (estrategia IP).

Selección artificial: Se simularon 10 generaciones de selección artificial. Se formaron aleatoriamente 100 familias con los fundadores y se generaron 10 hijos de cada familia. De los 1.000 individuos disponibles en cada generación se seleccionaron los 100 machos y 100 hembras con los valores fenotípicos más altos para el carácter.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población base: La estrategia IP, utilizando un gran número de SNP, llevó a una media fenotípica inicial 7% más alta que la estrategia E, al mismo nivel de diversidad genética (Tabla 1). La ventaja del método IP será mayor cuanto más diferenciadas estén las líneas candidatas. Con pocos marcadores se obtienen medias fenotípicas más altas pero menor diversidad que la esperada. Esto es debido al menor LD entre los marcadores y el resto de loci (selectivos o no marcadores).

Tabla 1. Valor fenotípico promedio y heterocigosidad esperada (en porcentaje) en la población base bajo diferentes estrategias usando diferentes números de marcadores (n_m)

n_m	Valor fenotípico					Heterocigosidad esperada				
	E	MC	MP	IC	IP	E	MC	MP	IC	IP
100	106,27	104,07	109,49	104,32	115,50	45,24	45,42	44,70	45,49	43,93
1.000	105,95	103,94	108,15	104,13	113,05	45,34	45,71	45,27	45,74	45,08
100.000	106,08	103,97	108,12	103,97	112,58	45,33	45,72	45,31	45,84	45,33

Los errores estándar del valor fenotípico oscilaron entre 0,13 y 0,25 y los de la heterocigosidad esperada fueron menores del 0,01%

La diversidad mantenida en la población base fue muy similar para todas las estrategias. El mejor método (IC) capturó solo un 1,1% más variabilidad neutra que la estrategia E. En general, cuanto mayor fue el número de SNP usados mayor fue la diversidad capturada, pero las diferencias fueron pequeñas. Pasar de 100 marcadores a 100.000 llevó a un aumento del 3% en He . También fueron pequeñas las diferencias observadas utilizando datos individuales o valores promedio de las líneas en la optimización, especialmente si el número de SNP era alto.

Selección artificial: Los niveles promedio más altos del valor mejorante y del fenotipo se obtuvieron con la estrategia IP en todas las generaciones (Figura 1) y en todos los escenarios, a pesar de que las poblaciones base obtenidas con IP partían de los niveles más bajos de V_A para el carácter. Como ya se comentó anteriormente, una densidad baja de SNP lleva a valores mejorantes más altos, pero también a una menor variabilidad neutra y selectiva debido a la falta de LD entre marcadores y el resto de loci. El valor medio del carácter durante las 10 generaciones de selección fue prácticamente igual para las estrategias IC y MC cuando se usó un panel con muchos SNP. Las estrategias IC y MC (que sólo utilizan la diversidad como criterio de optimización) condujeron a tasas de parentesco y consanguinidad más elevadas que el resto de estrategias durante el programa de mejora. Esto se debe a que IC y MC llevan a incluir en la población base individuos de líneas de fenotipo bajo cuyos descendientes no serán seleccionados subsecuentemente, lo que conlleva una reducción en el censo efectivo y el correspondiente incremento en parentesco. Este proceso es más importante en las primeras generaciones (Figura 1).

Las principales conclusiones de este estudio son: i) es posible llegar a soluciones que equilibren el nivel fenotípico y el mantenimiento de diversidad; ii) los mayores niveles para el carácter de interés se mantienen durante todas las generaciones del programa de selección; iii) es conveniente incluir en la población base individuos que provengan de líneas ya mejoradas; iv) no se observan grandes pérdidas en eficiencia cuando se trabaja con medias poblacionales en vez de con valores individuales; v) no son necesarios paneles de marcadores excesivamente densos (unos 1.000 SNP podrían ser suficientes para equilibrar fenotipo y diversidad).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Holtsmark, M. et al. 2008. *Aquaculture* 274: 232–240.

Agradecimientos: Este trabajo se ha financiado con los proyectos FISHBOOST (KBBE.2013.1.2-10) de la Unión Europea y CGL2012-39861-C02-02 del Plan Nacional.

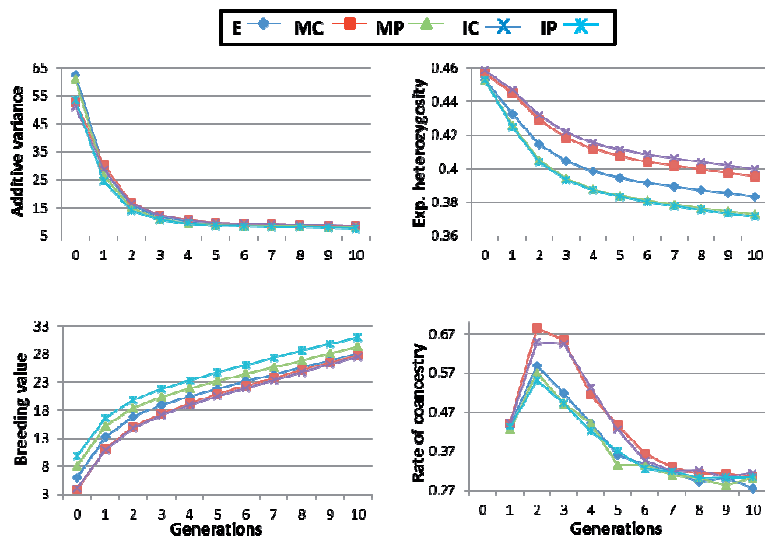


Figura 1. Evolución de la varianza aditiva para el carácter seleccionado, heterocigosidad esperada, valores mejorantes y tasa de consanguinidad durante las generaciones de selección artificial bajo las diferentes estrategias utilizadas para crear la población base

OPTIMISATION OF THE CREATION OF BASE POPULATIONS IN AQUACULTURE BREEDING PROGRAMS

ABSTRACT: The success of an aquaculture breeding program critically depends on the way in which the base population of breeders is constructed since all the genetic variability for any trait is contained in those initial founders. Traditionally base populations were created from a number of wild strains by sampling equal numbers from each strain. However, if improved strains are already available, mean phenotypic values for economically important traits can be used as a criterion to optimize the sampling. Also, the increasing availability of genome-wide genotype information in aquaculture species could help in the estimation of relationships within and between strains and to optimize the percentage of individuals to be sampled from them. This study explores the advantages of using phenotypic and genome-wide information when constructing base populations for aquaculture breeding programs in terms of initial and subsequent trait performance and genetic diversity level. Results show that compromise solutions between diversity and performance exist. Up to 7% higher levels of phenotypic performance can be achieved at the same level of global diversity in the base population by optimizing the selection of breeders instead of sampling equal numbers from each strain. The higher performance observed in the base population persisted during ten generations of phenotypic selection applied in the subsequent breeding program.

Keywords: base populations, aquaculture breeding programs, optimal contributions, fish genomics

EVALUACIÓN DEL USO DE MARCADORES GENÉTICOS EN LA PREDICCIÓN DEL VALOR GENÉTICO DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDO

Ros-Freixedes¹, R., Tor, M., Pena, R.N., y Estany, J.
Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida–Agrotecnio Centre,
Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida. ¹rrs@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El contenido de grasa intramuscular (GIM) y su composición de ácidos grasos son caracteres importantes para garantizar la calidad de la carne fresca y los productos curados desde los puntos de vista organoléptico, tecnológico y nutricional. Se han encontrado polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) fuertemente asociados a la cantidad y a la calidad de la grasa en los genes *LEPR* (receptor de la leptina; Óvilo et al., 2005; Galve et al., 2012) y *SCD* (estearoil-CoA desaturasa; Estany et al., 2014), respectivamente. Por otro lado, la selección genómica se ha presentado como una herramienta especialmente útil para mejorar genéticamente caracteres difíciles de medir, como los de calidad de la carne. Debido a los costes de genotipado, los beneficios de la selección genómica y de la selección asistida por marcadores deben ser contrastados con los de la selección basada exclusivamente en registros fenotípicos y genealogía. Además, existen estrategias de evaluación genética que combinan ambas fuentes de información. El objetivo de este trabajo fue realizar un primer estudio de comparación de la precisión de las evaluaciones genéticas para el contenido y la composición en ácidos grasos de GIM cuando se dispone solo de registros fenotípicos, de marcadores genéticos en *LEPR* y *SCD*, o de datos de genotipado de alta densidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se genotiparon 138 cerdos castrados Duroc representativos de la población descrita en Ros-Freixedes et al. (2014) usando el chip PorcineSNP60 v2 Genotyping BeadChip (Illumina, CA). La mitad de los animales nacieron en 2002-2003 (n=66, hijos de 29 machos y 57 hembras) y la otra mitad en 2009-2010 (n=72, hijos de 25 machos y 69 hembras). Los animales se criaron en condiciones comerciales de engorde en un total de 6 lotes (3 por periodo) y se sacrificaron a los 210 días de edad. Se tomaron muestras de músculo *gluteus medius* y se analizó su contenido de GIM y de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), incluyendo el ácido oleico (C18:1), y poliinsaturados (AGPI) por cromatografía de gases. Se calcularon los índices de desaturación de ácido esteárico a C18:1 (C18:1/C18:0) y AGS/AGPI.

Se descartaron los SNPs con frecuencias del alelo menor por debajo de 0,05 o porcentajes de genotipado menores que 0,95 y los animales con menos del 90% de SNPs genotipados. También se descartaron los SNPs no mapeados en el actual ensamblaje genómico *Sus scrofa* Build 10.2, con lo que finalmente se trabajó con datos de 135 animales y 36.432 SNPs. Por otra parte, se seleccionaron dos SNP, uno en *LEPR* (exón 14) y otro en *SCD* (promotor), que fueron genotipados independientemente para un mayor número de animales (n=803 y n=915, respectivamente).

Se predijo el valor genético de 70 cerdos genotipados nacidos en 2009-2010 y se calculó la precisión de la predicción como la correlación entre el valor genético predicho y el fenotipo ajustado por lote y edad al sacrificio usando un modelo fijo. Las predicciones se realizaron según las cuatro siguientes metodologías, siempre con lote y edad como efectos fijos:

(A) Predicción genómica basada en los efectos aditivos de los SNPs estimados usando Bayes B y los datos de los 65 animales genotipados nacidos en 2002-2003, incluyendo todos los 36.432 SNPs (36k) o solo dos SNPs de los loci *LEPR* y *SCD* (*LEPR+SCD*) en los análisis. Para ello, se usó el software GenSel (Fernando y Garrick, 2009).

(B) BLUP univariante (U) o multivariante (M). Los modelos multivariantes incluyeron peso vivo y espesor de grasa dorsal a los 180 días (n≈100.000). En todos los casos se incluyeron datos de GIM y ácidos grasos de cerdos nacidos entre 2002 y 2007 (con bajo grado de parentesco, BGP; n=936) y, según el caso, se incluyeron, además, registros de hermanos de la misma camada que los testados (C; n=196). Se usó el software AIREMLF90 (Misztal et al., 2002).

(C) BLUP genómico (ssGBLUP; Legarra et al., 2014) usando los 36k SNPs y los mismos datos fenotípicos que en el caso B.

(D) Idéntico al caso B pero añadiendo los genotipos de los SNP en *LEPR* (n=803) y *SCD* (n=915) como efectos fijos del modelo. El valor genético de un animal se calculó como la suma del valor genotípico de cada marcador y el efecto poligénico ajustado por los marcadores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las correlaciones entre valor genético predicho y fenotipo ajustado de los cerdos nacidos en 2009-2010 se muestran en la Tabla 1. Las correlaciones no se estandarizaron por la raíz cuadrada de la heredabilidad.

Tabla 1. Correlaciones entre valor genético predicho y fenotipo ajustado de los cerdos nacidos en 2009-2010 (n=70) según metodología predictiva

Metodología	Carácter						
	GIM	AGS	AGMI	C18:1	AGPI	C18:1/C18:0	AGS/AGPI
(A) Bayes B							
36k	0,04	0,48	0,50	0,28	0,07	0,60	0,10
<i>LEPR</i> + <i>SCD</i>	0,32	0,43	0,46	0,37	0,42	0,54	0,36
(B) BLUP							
U, BGP	0,11	0,11	0,08	0,12	0,16	0,07	0,13
U, BGP+C	0,31	0,15	0,32	0,32	0,39	0,14	0,39
M, BGP	0,41	0,39	0,30	0,29	0,61	0,08	0,60
M, BGP+C	0,42	0,41	0,40	0,38	0,67	0,15	0,67
(C) ssGBLUP con los 36k SNPs							
U, BGP	0,13	0,14	0,07	0,11	0,26	0,02	0,23
U, BGP+C	0,31	0,15	0,34	0,34	0,48	0,15	0,45
M, BGP	0,39	0,40	0,27	0,27	0,61	0,05	0,61
M, BGP+C	0,39	0,38	0,39	0,38	0,67	0,17	0,65
(D) BLUP con genotipos de <i>LEPR</i> y <i>SCD</i> como efectos fijos							
U, BGP	0,34	0,50	0,39	0,31	0,41	0,51	0,41
U, BGP+C	0,42	0,52	0,51	0,44	0,51	0,53	0,51
M, BGP	0,47	0,59	0,48	0,41	0,65	0,50	0,63
M, BGP+C	0,47	0,62	0,55	0,48	0,70	0,53	0,70

La predicción genómica por Bayes B usando todos los SNPs disponibles generó precisiones dispares: altas (0,48-0,60) para AGS, AGMI y C18:1/C18:0, moderada (0,28) para C18:1, y bajas (0,04-0,10) para GIM, AGPI y AGS/AGPI. Sin embargo, cuando la estimación de los valores aditivos y la predicción de los valores genéticos se realizó solo con los genotipos de cuatro marcadores de los loci de *LEPR* y *SCD*, las precisiones de los caracteres peor predichos incrementaron hasta 0,32-0,42, con solo una pequeña penalización para las de los caracteres con mejores predicciones (0,43-0,54). Se demostró, por lo tanto, que los marcadores genéticos en *LEPR* y *SCD* tienen una alta capacidad predictiva para los caracteres estudiados.

Cuando los caracteres fueron evaluados genéticamente mediante BLUP univariante sin marcadores, se obtuvieron precisiones moderadas (0,31-0,39) para algunos caracteres cuando se incluyeron los fenotipos de hermanos de la misma camada. En esquemas de selección comerciales es de esperar que caracteres de rendimiento como peso vivo y espesor de grasa dorsal sean registrados de forma rutinaria, por lo que, además, la información de estos caracteres se podrá tener en cuenta usando un modelo multivariante. Así, se consiguieron precisiones similares o superiores a las obtenidas con Bayes B, incluso cuando solo había fenotipos con bajo grado de parentesco, salvo para C18:1/C18:0 (no correlacionado con peso ni espesor de grasa dorsal).

Las precisiones no mejoraron en el caso de ssGBLUP respecto al BLUP, probablemente debido al bajo número de animales genotipados y el bajo grado de parentesco entre los animales de referencia y los testados. En cambio, con BLUP con los genotipos de *LEPR* y *SCD* como efectos fijos se obtuvieron las mejores precisiones. En el caso de un modelo

univariante y solo fenotipos con bajo grado de parentesco, las precisiones usando los genotipos de *SCD* y *LEPR* fueron parecidas a las obtenidas con Bayes B cuando solo se usaron marcadores de estos dos loci. Añadiendo fenotipos de hermanos de la misma camada y de peso y espesor de grasa dorsal, las precisiones fueron de 0,47-0,48 para GIM y C18:1, 0,53-0,55 para AGMI y C18:1/C18:0, y tan altos como 0,62-0,70 para AGS, AGPI y AGS/AGPI. En comparación con BLUP sin marcadores, los marcadores mejoraron sustancialmente la precisión de AGS, AGMI, C18:1 y C18:1/C18:0, pero su contribución a la predicción de GIM, AGPI y AGS/AGPI resultó irrelevante.

Estos resultados indican que se pueden obtener precisiones razonables en la predicción de los valores genéticos de contenido y composición de GIM basando las evaluaciones solo en registros fenotípicos de parientes cercanos y caracteres de rendimiento correlacionados. Así, un programa de mejora genética para GIM y ácidos grasos debería centrarse primero en diseñar un sistema de registro rutinario de GIM y C18:1 en matadero, aunque esto requiera trazar individualmente los cerdos hasta el sacrificio. Algunos marcadores genéticos, como los propuestos en *LEPR* y *SCD*, pueden mejorar la precisión de los valores genéticos BLUP en algunos caracteres. El uso de unos pocos marcadores bien elegidos abre las puertas al desarrollo de chips de baja densidad (Weigel et al., 2009; Vazquez et al., 2010) con los que poder genotipar un mayor número de individuos y mejorar la toma de decisiones de selección.

En conclusión, mientras se evalúan los beneficios de la selección genómica, la selección basada en la combinación de registros fenotípicos y marcadores genéticos cuidadosamente escogidos se presenta como una buena alternativa para la mejora del contenido y la composición de GIM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Estany et al. 2014. PLoS One 9: e86177.
- Fernando y Garrick. 2009. Iowa State University. Disponible en (27 de enero de 2015): <http://big.ansci.iastate.edu/>
- Galve et al. 2012. Livest. Sci. 145: 145-152.
- Legarra et al. 2014. Livest. Sci. 166: 54-65.
- Misztal et al. 2002. Proc. 7th WCGALP, Montpellier, France.
- Óvilo et al. 2005. Genet. Res. 85: 57-67.
- Ros-Freixedes et al. 2014. J. Anim. Sci. 92: 5417-5425.
- Vazquez et al. 2010. J. Dairy Sci. 93: 5942-5949.
- Weigel et al. 2009. J. Dairy Sci. 92: 5248-5257.

Agradecimientos: Agradecemos a Josep Reixach de Selecció Batallé la colaboración en el experimento. Proyecto financiado por el MINECO (AGL2012-33529).

EVALUATION OF THE INCLUSION OF GENETIC MARKERS FOR THE PREDICTION OF THE BREEDING VALUE FOR INTRAMUSCULAR FAT CONTENT AND FATTY ACID COMPOSITION IN PIG

ABSTRACT: Intramuscular fat (IMF) content and fatty acid composition are important factors influencing pork quality. Genomic selection has been proposed as particularly useful for traits which are difficult to measure, and strong associations have already been found between single nucleotide polymorphisms at the *LEPR* and *SCD* loci and IMF content and composition. However, due to genotyping costs, the suitability of genomic and marker-assisted selection programs should be assessed. We compared the accuracy of the breeding values predicted by four methodologies that differ in their use of phenotypic and genotypic information. Results indicated that good accuracies can be achieved by using only phenotypes if data from close relatives and correlated performance traits are available. Genomic predictions using high-density chips performed disparately in our study, but markers at the *LEPR* and *SCD* loci were enough to provide moderate to high accuracies for all traits. Data in the study were insufficient to assess the performance of single-step genomic BLUP, but BLUP accounting for genetic markers at the two studied loci as fixed effects provided the best accuracies. In conclusion, we recommend genetic evaluations for IMF and fatty acids content combining phenotypic records and singled-out genetic markers.

Keywords: fatty acids, genetic markers, genomic selection, intramuscular fat

EFFECTO DE LA SELECCIÓN POR VARIANZA RESIDUAL DEL TAMAÑO DE CAMADA SOBRE LA CONDICIÓN CORPORAL DE LA CONEJA

Calle, E. W.¹, García, M.L.², Blasco, A.¹ y Argente, M.J.²

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València, P.O. Box 22012. 46071 Valencia, Spain.

²Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra de Beniel Km 3.2, 03312 Orihuela, Spain.

edcalay@doctor.upv.es

INTRODUCCIÓN

La condición corporal tiene un papel importante en la reproducción de la hembra. En este sentido, se ha observado que una reducción de la condición corporal disminuye la fertilidad (Castellini et al., 2010, en conejo; Zak et al., 1997, en cerdo), la tasa de ovulación (Zak et al., 1997) y el desarrollo de la progenie e incrementa la mortalidad pre-destete (Milisits y Lévai, 2004, en conejo; Rauw et al., 2003, en ratón). La selección por tamaño de camada tiende a mostrar una ligera respuesta correlacionada positiva con la condición corporal y las reservas corporales de la coneja (Pascual et al., 2013).

En conejo, la selección divergente por varianza residual del tamaño de camada ha tenido éxito. Tras seis generaciones de selección, las líneas de alta (H) y de baja (L) varianza residual mostraron una diferencia de 1,17 gazapos² para el carácter objeto de selección (lo que supone un 30% del valor encontrado en la generación base), y una respuesta correlacionada del 6% para el número total de nacidos al parto (Sánchez et al., 2013). Un mayor tamaño de camada en la línea L podría estar relacionado con una mejor condición corporal de la hembra. El objetivo del presente trabajo es analizar tanto si la selección por varianza residual del tamaño de camada ha afectado la condición corporal de la hembra, como si este carácter condiciona el tamaño de camada y sus componentes, tasa de ovulación y número de embriones implantados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Un total de 83 hembras de la línea H y 74 de la línea L, pertenecientes a la séptima generación del experimento de selección por varianza residual del tamaño de camada, fueron utilizadas en este experimento. Las hembras fueron pesadas en la segunda monta, en el segundo parto y a los 10 días de su segunda lactación. También se midió la condición corporal de las hembras en dichos momentos, a través del espesor de grasa perirenal siguiendo la metodología de Pascual et al. (2004). A los 12 días de la segunda gestación se realizó una laparoscopia para estimar la tasa de ovulación y el número de embriones implantados. Se contabilizó el número total de gazapos nacidos al segundo parto.

Caracteres: Los caracteres analizados fueron: el peso de la hembra en la segunda monta (P_m , g), el incremento de peso de la monta al parto (IP_{m-p} , g), el incremento de peso del parto a los 10 días de lactación (IP_{p-10d} , g), la grasa perirenal en la segunda monta (G_m , mm), el incremento de grasa perirenal de la monta al parto (IG_{m-p} , mm), el incremento de la grasa perirenal del parto a los 10 días de lactación (IG_{p-10d} , mm), la tasa de ovulación (TO) y el número de embriones implantados a los 12 días de la segunda gestación (EI), y el número total de gazapos nacidos al segundo parto (NT).

Análisis estadísticos: Todos los análisis se realizaron utilizando metodología bayesiana. El modelo para P_m , IP_{m-p} , IP_{p-10d} , G_m , IG_{m-p} , IG_{p-10d} , TO, EI y NT incluyó el efecto de línea (con dos niveles: línea de alta (H) y de baja (L) varianza residual para el tamaño de camada), estado de lactación (con dos niveles: lactantes y no lactantes) y estación (con dos niveles: invierno y primavera). Para estudiar la supervivencia pre-implantación y post-implantación, el modelo para EI y NT incluyó las covariables TO y EI, respectivamente. Para analizar la relación del espesor de la grasa perirenal con TO, EI y NT, el modelo incluyó la covariable G_m . Se utilizaron a priori planos acotados para todos los efectos sistémicos. Los residuos se distribuyeron normalmente con media 0 y varianza σ_e^2 . Los a priori de las varianzas fueron también planos acotados. Las distribuciones marginales posteriores de las

diferencias entre líneas se estimaron usando muestro de Gibbs. Se usó el programa Rabbit desarrollado por el Instituto de Ciencia Animal y Tecnología (Valencia, España). Se tomaron cadenas de 60.000 iteraciones con un periodo de quemado de 10.000 iteraciones, y se guardó una muestra de cada 10 iteraciones. La convergencia fue testada usando el criterio Z de Geweke y los errores Monte Carlo fueron obtenidos por series temporales (Sorensen y Gianola, 2002). Se consideró 1/3 de la desviación típica de cada carácter como valor relevante (R), y se estimó la probabilidad de similitud (P_s) como la probabilidad de que la diferencia entre líneas en valor absoluto sea mayor que R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra las medias y la desviación estándar de los caracteres analizados en la línea H, así como los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre las líneas H y L. Después de siete generaciones de selección, el peso y la grasa perirenal de la hembra en la segunda monta fue similar en ambas líneas ($P_s=94\%$ y $P_s=97\%$, respectivamente). Desde la segunda monta hasta el parto las hembras de la línea H experimentaron una disminución del peso (IP_{m-p} , -235 g) y espesor de grasa perirenal (IG_{m-p} , -0,30 mm). Esta disminución fue similar en ambas líneas ($P_s=91\%$ y $P_s=84\%$, respectivamente). Las pérdidas en peso y grasa perirenal al parto están relacionadas con la disminución de la ingesta en los días previos al parto y con la alta demanda energética durante la lactación (Fortun-Lamothe et al., 2006). Tras el parto y hasta los 10 días de lactación, las hembras de la línea H mostraron un incremento del peso (IP_{p-10d} , 150 g) y espesor de la grasa perirenal (IG_{p-10d} , 0,05 mm), tal y como otros autores han encontrado (Thielgaard et al., 2007). Las hembras de la línea H tienden a mostrar un mayor incremento de peso en este periodo ($D_{H-L}=69$ g, $P(D>0) = 94\%$) que las de la línea L. A pesar de que ambas líneas muestran una tasa de ovulación similar ($P_s=80\%$), las hembras de la línea H implantaron aproximadamente un gazapo menos que las hembras de la línea L, tras incluir la TO como covariable ($D_{H-L} = -0,99$ embriones, $P(D<0)=96\%$). Esta diferencia se mantiene al parto ($D_{H-L} = -0,95$ gazapos, $P(D<0)=89\%$).

La Tabla 2 muestra los parámetros de las distribuciones marginales posteriores del coeficiente de regresión (b) entre TO, EI y NT con G_m para las hembras de las líneas H y L. La TO está relacionada con la condición corporal de la hembra (G_m), aunque el coeficiente de regresión fue menor en las hembras de la línea H ($b=0,20$, $P(b>0)=68\%$) que en las de la línea L ($b=0,84$, $P(b>0)=97\%$). En otros trabajos se ha observado una relación positiva entre el peso de la coneja y la TO (Peiró et al., 2010; Agea et al., 2007). Los coeficientes de regresión entre EI y G_m presentan amplios HPD al 95% y la probabilidad de que el coeficiente de regresión entre ambos caracteres sea positivo fue baja en la línea H ($P(b>0)=75\%$) y en la línea L ($P(b>0)=53\%$). Este resultado podría explicarse porque en las etapas previas a la implantación el embrión depende de las reservas de su saco vitelino y son éstas las que tienen un papel importante en su desarrollo y su supervivencia (Carney et al., 2004). Respecto al coeficiente de regresión entre NT y G_m , éste sigue siendo menor en la línea H ($b=0,30$, $P(b>0)=71\%$) que en la línea L ($b=0,76$, $P(b>0)=90\%$).

CONCLUSIÓN

La selección por varianza residual del tamaño de camada no parece haber afectado a la condición corporal de la hembra. Sin embargo, la condición corporal de la hembra muestra una relación más estrecha con la tasa de ovulación y nacidos totales en la línea seleccionada para reducir la varianza residual del tamaño de camada (L) que en la línea seleccionada para incrementarla (H).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agea et al., 2007. ITEA 28 1: 72-74.
- Castellini et al., 2010. Anim. Reprod. Sci. 122: 174-182.
- Carney et al., 2004. Birth Defects Res. Part C 72:345-360.
- Fortun-Lamothe et al., 2006. Anim. Reprod. Sci. 93:1-15.
- Milisits, G. & Lévai, A. 2004. Acta Agriculturae Slovenica, 1: 161-167.
- Pascual et al., 2004. World Rabbit Sci. 12: 7-21.
- Pascual et al., 2013. World Rabbit Sci. 21: 123-144.
- Peiró et al., 2010. WCGALP, pp 496.
- Rauw et al., 2003. Anim. Sci. 81: 939-944.
- Sánchez et al., 2013. ITEA II: 463-465.
- Sorensen, D. & Gianola D. 2002. New York:

Springer. Theilgaard et al., 2007. Genetic Selection Evolution. 39: 2007-223. Zak et al., 1997. J. Reprod. Fertil. 110: 99-106.

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

Tabla 1. Media y Desviación Estándar (DE) en la línea de alta varianza residual para el tamaño de camada (H), y parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre la línea de alta (H) y de baja (L) varianza residual para el tamaño de camada.

	Media(H)	DE	D_{H-L}	HPD _{95%}	P	R	P_s
P_m , g	3635	395	-30	-149, 94	69	-130	94
IP_{m-p} , g	-235	329	17	-90, 129	62	100	91
IP_{p-10d} , g	150	230	69	-19, 159	94	75	55
G_m , mm	9,33	0,83	-0,03	-0,28, 0,24	59	-0,30	97
IG_{m-p} , mm	-0,30	0,90	-0,12	-0,44, 0,22	76	-0,30	84
IG_{p-10d} , mm	0,04	0,96	0,05	-0,27, 0,38	63	0,30	84
TO	13,12	2,52	-0,39	-1,34, 0,46	80	-0,8	80
EI	10,42	3,36	-1,30	-2,50, -0,04	98	-1,1	37
EI_{TO}	11,11	2,79	-0,99	-2,08, 0,04	96	-0,8	36
NT_{EI}	7,10	3,26	-0,03	-1,43, 1,05	50	-1,1	94
NT	6,96	3,96	-0,95	-2,33, 0,57	89	-1,1	58

P_m : el peso a la 2ª monta. IP_{m-p} : el incremento de peso de la monta al parto. IP_{p-10d} : incremento de peso del parto a los 10 días de lactación. G_m : la grasa perirenal. IG_{m-p} : incremento de grasa perirenal de la monta al parto. IG_{p-10d} : incremento de la grasa perirenal del parto a los 10 días de lactación. TO: tasa de ovulación. EI: embriones implantados. EI_{TO} : embriones implantados corregido por la covariable tasa de ovulación. NT_{EI} : nacidos totales corregido por la covariable embriones implantados. NT: nacidos totales. D_{H-L} : mediana posterior de la diferencia entre las líneas H y L. HPD_{95%}: región de alta densidad posterior al 95%. P: P ($D > 0$) y P ($D < 0$) cuando $D < 0$. R: valor relevante. P_s : probabilidad de similitud (probabilidad de que la D en valor absoluto sea menor que R).

Tabla 2. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores del coeficiente de regresión (b) en las líneas de alta (H) y de baja (L) varianza residual para el tamaño de camada.

Y	X	b en la línea H			b en la línea L		
		Mediana	HPD _{95%}	P	Mediana	HPD _{95%}	P
TO	G_m	0,20	-0,58, 1,09	68	0,84	0,02, 1,73	97
EI	G_m	0,42	-0,65, 1,63	75	0,03	-1,19, 1,29	53
NT	G_m	0,30	-0,83, 1,30	71	0,76	-0,30, 1,88	90

TO: tasa de ovulación. EI: embriones implantados. NT: nacidos totales. G_m : grasa perirenal a la monta. HPD_{95%}: región de alta densidad posterior al 95%. P: P ($b > 0$).

EFFECT OF SELECTION FOR RESIDUAL VARIANCE OF LITTER SIZE ON BODY CONDITION IN RABBIT DOES

ABSTRACT: The aim of this study is to analyse the effect of divergent selection for residual variance of litter size on body condition (BC), measured as perirenal fat thickness (PFT), and to find whether BC is related to litter size (LS) and its components, ovulation rate (OR) implanted embryos (IE). The high (H) and low (L) lines have similar PFT. The L line shows higher coefficient of regression between PFT and OR than H line (0.84 vs 0.20), and between PFT and LS (0.76 vs 0.30). In conclusion, relationships between BC and OR and LS seem to be different between lines.

Keywords: residual variance, body condition, ovulation rate, rabbits

COMPARACION DE GRADOS DE MADUREZ EN LINEAS COMERCIALES SELECCIONADAS POR DIFERENTES CARACTERES EN CONEJOS

Calle,¹ E.W., Blasco,¹ A. y Pascual,² M.

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

²Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir".

*edcalay@doctor.upv.es

INTRODUCCIÓN

Las líneas comerciales seleccionadas por diferentes criterios en la Universitat Politècnica de València han sido en algunas ocasiones comparadas al mismo peso de sacrificio (Pla et al., 1996; Pla et al., 1998). Sin embargo, si el tamaño adulto de los grupos es diferente, los grupos están en un diferente estado de madurez. Las características de la canal y de la carne podrían diferir no solo debido a los tratamientos aplicados en el experimento sino también al diferente estado de madurez (Pascual et al., 2008). El efecto de la raza o tratamiento debe por tanto ser estudiado comparando al mismo grado de madurez. Las estimaciones de peso adulto son escasas, por lo que las comparaciones son en ocasiones realizadas a la misma edad, como una aproximación al mismo estado de madurez (Hernández et al., 2006). Sin embargo, la aproximación puede no ser suficientemente precisa. El objetivo de este trabajo es ver si estas líneas comerciales están en el mismo estado de madurez cuando son comparadas a la edad de sacrificio.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo con 10163 conejos del animalario de la Universitat Politècnica de València, nacidos entre Junio de 2012 y Octubre de 2013. Los conejos procedieron de las líneas maternas V (4238 conejos; generación 39) y A (3902 conejos; generación 44) seleccionadas por tamaño de camada, y de la línea paterna R (2023 conejos; generación 25), seleccionada por velocidad de crecimiento.

Los conejos fueron pesados a los 28 días (edad de destete; P_{28}) y 63 días (edad de selección; P_{63}). A una determinada edad, un total de 44, 26 y 40 conejas de las líneas A, V y R, respectivamente, fueron pesadas para determinar el peso adulto (PA). Las conejas tenían entre 30 y 80 semanas de edad con un promedio de 48 semanas.

Se estimaron las medias mínimo cuadráticas de P_{28} , P_{63} y la velocidad de crecimiento entre los 28 y 63 días de edad [$VC_{28,63} = (P_{63} - P_{28}) / 35$], aplicando un modelo con línea, sexo y mes de selección (12 niveles) como efectos fijos. Posteriormente, el P_{28} y P_{63} fueron corregidos por el efecto mes de selección. Además, el peso adulto PA fue corregido por el estado de lactación (2 niveles; lactantes y no lactantes). Por otra parte, el P_{28} , P_{63} y PA de las conejas seleccionadas fueron divididos por un coeficiente para corregir el sesgo de la selección por peso. El coeficiente dentro de cada línea fue calculado como la relación entre peso promedio a los 63 días de edad de las conejas seleccionadas de la línea y el peso promedio a los 63 días de edad de los conejos de la línea. Los pesos corregidos (P_{28} , P_{63} y PA) fueron utilizados para el cálculo del grado de madurez en los diferentes estados. Los grados de madurez a los 28 y 63 días de edad (gm_{28} y gm_{63} , respectivamente) fueron obtenidos como el cociente entre el P_{28}/PA y P_{63}/PA , respectivamente. El grado de madurez a 2000g de peso vivo (gm_{2000}) fue obtenido como $2000/PA$. El tiempo para llegar a 2000g se calculó como $[28 + (2000 - P_{28})/35 \cdot (P_{63} - P_{28})]$. La edad en la que los conejos llegaron a un 40% del grado de madurez (T40%) fue calculada como $[28 + (0,4 \cdot PA - P_{28}) \cdot 35 / (P_{63} - P_{28})]$. Las medias mínimo cuadráticas de P_{28} , P_{63} , PA, gm_{28} , gm_{63} , gm_{2000} , T_{2000} y T40% fueron obtenidas aplicando un modelo con línea como efecto fijo. Finalmente, se realizó un análisis de robustez variando en una desviación típica el peso adulto dentro de cada línea. El análisis estadístico se realizó mediante el programa GLM del paquete estadístico SAS (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento durante 25 generaciones, mostró mayores pesos a las edades de destete y selección que las líneas A y V (Tablas 1 y 2). El mayor peso a la edad de selección se ha observado en otros trabajos (Hernández et al., 2006).

Las diferencias en el grado de madurez en el momento del sacrificio (63 días, tabla 2) se pueden considerar poco relevantes (máximo un 2,6 % entre las líneas A y V) ya que la diferencia es inferior a una desviación típica del carácter (d.t.=3,8%; resultados no mostrados). De hecho, el tiempo para llegar a un similar grado de madurez (T40%) difiere en entre 0,9 y 3,5 días. Esta diferencia no es lo suficientemente relevante para compensar la inseminación de las hembras de las diferentes líneas en una fecha diferente para alcanzar el tiempo al sacrificio el mismo día. Los resultados obtenidos tras variar el peso adulto en una desviación típica indican que los resultados son robustos a posibles errores de muestreo en el caso de que la muestra considerada en el experimento para la estimación de los pesos adultos no sea representativa de la línea.

Las conejas seleccionadas en las que se controló el peso adulto difirieron en peso a los 63 días respecto al conjunto de todas las hembras de la población. La relación entre peso promedio de las conejas seleccionadas fue 1,036, 1,048, 1,080 en las líneas A, V y R, respectivamente. Las diferencias de peso eran previsibles en la línea R pero no en las otras líneas, indicando una ligera selección inadvertida por peso. El factor de corrección por utilizar en la estimación de pesos adultos animales seleccionados se calculó con los pesos a los 63 días, que es cuando se disponía de la totalidad de los animales, bajo el supuesto de que los factores deben ser similares al peso adulto, ya que la selección actúa como un efecto de escala, aumentando los pesos a lo largo de toda la curva (Blasco et al., 2003).

El mayor peso adulto en la línea R con respecto a la línea A y V (Tabla 2) es consecuencia del origen de la línea y de la selección por velocidad de crecimiento. Medidas a la misma edad, las diferencias en el grado de madurez entre la línea R y las líneas en estudio a la edad de selección no son relevantes. Sin embargo, el grado de madurez es más bajo en la línea R si las líneas son comparadas al mismo peso. La selección por crecimiento es común en las líneas paternas de conejos (Baselga, 2004). La ventaja del uso de las líneas es la reducción de la edad al sacrificio, ya que el peso es fijado por el mercado. La disminución en el grado de madurez de los conejos a la edad de sacrificio lleva a cambios en la canal y composición de carne, ya que el bajo grado de madurez está asociado a un mayor porcentaje de los tejidos de temprano crecimiento (e.g. los huesos), órganos (e.g. las vísceras torácicas, el tracto gastrointestinal) y partes de la canal (e.g. las partes distales) en detrimento de tejidos de crecimiento tardío (e.g. la grasa) y partes de la canal (e.g. la parte central) (Pascual et al., 2008).

CONCLUSIONES

Las diferencias entre las líneas estudiadas en grado de madurez a los 63 días de edad son poco relevantes, por lo que la comparación a esta edad es una aproximación suficientemente precisa cuando se pretende separar el efecto de línea del efecto de grado de madurez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Baselga M. 2004. 8th World Rabbit Congress 1, 1-13. •Blasco A., Piles M., Varona L. 2003. Genet. Sel. Evol. 35, 21-41. •Hernandez P., Ariño B., Grimal A., Blasco A. 2006. Meat Sci. 73, 645-650. •Pascual M., Pla M., Blasco A. 2008. J. Anim. Sci. 86, 3409-3417. •Piles M. & Blasco A. 2003. World Rab. Sci., 11, 53-62. •Pla M., Guerrero L., Guardia D., Oliver M.A., Blasco A. 1998. Liv. Prod. Sci. 54, 115-123. •Pla M., Hernandez P., Blasco A. 1996. Meat Sci., 44, 85- 92.

Tabla 1. Medias mínimo cuadráticas (error estándar) de peso vivo a 28 (P_{28} , g) y 63 (P_{63} , g) días de edad y velocidad de crecimiento ($VC_{28,63}$, g/d) en conejos de las líneas A, V y R.

	A	V	R
n	3902	4238	2023
P_{28}	604(2,2) ^a	622(2,2) ^b	768(3,0) ^c
P_{63}	1734(3,6) ^a	1789(3,5) ^b	2390(4,8) ^c
$VC_{28,63}$	32,3(0,07) ^a	33,3(0,06) ^b	46,4(0,09) ^c

^{a,b,c} Medias en la misma fila con diferente superíndice son diferentes ($P < 0,05$).

Tabla 2. Medias mínimo cuadráticas (error estándar) de peso vivo a 28 (P_{28} , g) y 63 (P_{63} , g) días de edad, velocidad de crecimiento ($VC_{28,63}$, g/d), peso adulto (PA , g), grado de madurez a 28 (gm_{28}) días de edad, 63 (gm_{63}) días de edad y 2000g (gm_{2000}) de peso vivo, tiempo para alcanzar 2000g de peso vivo (T_{2000} , días) y tiempo para alcanzar un grado de madurez de 40% ($T_{40\%}$, días) en conejos de las líneas A, V y R.

	A	V	R
n	44	26	40
P_{28}	607(14,3) ^a	613(18,6) ^a	732(15,0) ^b
P_{63}	1746(18,8) ^a	1781(24,5) ^a	2371(19,8) ^b
$VC_{28,63}$	32,5(0,39) ^a	33,4(0,51) ^a	46,8(0,41) ^b
PA	4373(62,7) ^a	4190(81,5) ^a	5841(65,7) ^b
gm_{28}	14,0(0,31) ^b	14,7(0,40) ^b	12,6(0,32) ^a
gm_{63}	40,1(0,55) ^a	42,7(0,72) ^b	40,9(0,58) ^{ab}
gm_{2000}	46,0(0,55) ^b	48,1(0,71) ^c	34,5(0,57) ^a
T_{2000}	71,0(0,53) ^b	69,8(0,69) ^b	55,2(0,56) ^a
$T_{40\%}$	63,3(0,68) ^b	59,8(0,89) ^a	62,4(0,71) ^b

^{a,b,c} Medias en la misma fila con diferente superíndice son diferentes ($P < 0,05$).

COMPARISON OF DEGREES OF MATURITY IN COMERCIAL RABBIT LINES SELECTED FOR DIFERENT CRITERIA

ABSTRACT: The aim of this study was to analyze whether some commercial rabbit lines selected for different traits stay at the same stage of maturity when compared at the same age. The paternal line R, selected for growth rate, showed the higher weight at weaning (28 days of age), selection (63 days of age) and adult stage and higher growth rate respect to the maternal lines A and V, selected for litter size. Differences in degree of maturity at selection and time to arrive to 40% of degree of maturity were not considered relevant. Line R showed lower degree of maturity and lower time to arrive to a commercial weight of 2000g than lines A and V.

Keywords: Adult weight, degree of maturity, rabbit.

SELECCIÓN POR TASA DE OVULACIÓN Y TAMAÑO DE CAMADA EN CONEJO. RESPUESTA CORRELACIONADA EN SUPERVIVENCIA PRENATAL

Badawy^{1,2}, A.Y., Peiró^{1,3}, R., Blasco¹, A. y Santacreu, M.A.¹.

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

² Dirección actual: Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía.
Universidad del Canal de Suez, Ismailia, Egipto.

³ Dirección actual: Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana.
Universitat Politècnica de Valencia.
msantacr@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

En los experimentos de selección por tasa de ovulación en especies prolíficas, la baja respuesta en tamaño de camada ha sido debida a una disminución de la supervivencia prenatal (Laborda et al., 2012, en conejo; Leymaster y Christenson, 2000, Rosendo et al., 2007 en porcino). En conejos, Laborda et al. (2012) observan que la falta de respuesta en tamaño de camada al seleccionar por tasa de ovulación durante 10 generaciones se debe a una disminución de la supervivencia fetal (supervivencia desde la implantación hasta el nacimiento). La selección por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada fue propuesta en porcino como una alternativa para aumentar el tamaño de camada a través del aumento de la tasa de ovulación y de la supervivencia prenatal (Ruiz-Flores y 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 correlacionada en supervivencia embrionaria, fetal y prenatal después de diez 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 10 generaciones por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada (segundo periodo de selección). La selección por tasa de ovulación se realizó utilizando la tasa de ovulación estimada por laparoscopia en la segunda gestación; se aplicó una presión de selección del 30%. En la selección por niveles independientes, en la primera etapa se seleccionaron las hembras que presentaban una mayor tasa de ovulación por laparoscopia 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). Para controlar la consanguinidad, se dejaron descendientes de cada macho de los cruces con las mejores hembras.

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. En la última gestación se estimó la tasa de ovulación post-mortem.

Se han analizado un total de 4350 partos y 1980 tasas de ovulación de un total de 1275 hembras. La genealogía incluyó un total de 1563 animales.

Caracteres. Se ha analizado la tasa de ovulación (TO) y el número de embriones implantados (EI) en la segunda y última gestación, el tamaño de camada de un máximo de 7 partos (TC), la supervivencia embrionaria (SE=EI/TO) en la segunda y última gestación y la supervivencia fetal (SF=TC/EI) y prenatal (SP=TC/TO) en la segunda gestación. La TO se estimó como el número de cuerpos lúteos y EI como el número de implantaciones, ambos se contabilizaron 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, la supervivencia embrionaria 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 niveles para TO y SE y 46 niveles para TC, respectivamente), P_j es orden del parto (4 niveles para TO y SE y 5 niveles para 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 y ambiental de la hembra, y e_{ijklm} es el error del modelo. Para analizar la supervivencia fetal y prenatal se utilizó el modelo animal incluyendo el efecto año-estación y lactación, con 42 y 2 niveles, respectivamente.

Los parámetros genéticos fueron estimados con la metodología BLUP/REML, usando el programa VCE (Groeneveld, 1994). Se realizaron análisis bivariantes para TO y TC y trivariantes para estimar la respuesta correlacionada en SE, SF y SP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran las medias genéticas estimadas por generación para TO y TC y en la Figura 2 para SE, SF y SP. En el primer periodo, la selección por TO durante 6 generaciones ha incrementado la tasa de ovulación en aproximadamente 1,6 óvulos (0,26 óvulos por generación), sin embargo la respuesta correlacionada en TC ha sido menor, aproximadamente medio gazapo (0,08 gazapos por generación). Esta baja respuesta en tamaño de camada respecto al aumento de la tasa de ovulación se debe principalmente a un descenso de la supervivencia fetal (-3,52%). No se observó una respuesta correlacionada para la supervivencia embrionaria. Estos resultados están de acuerdo con lo observado en otros experimentos de selección por tasa de ovulación tanto en conejo (Laborda et al., 2012) como en porcino (Freking et al., 2007) y ratón (Bradford, 1969).

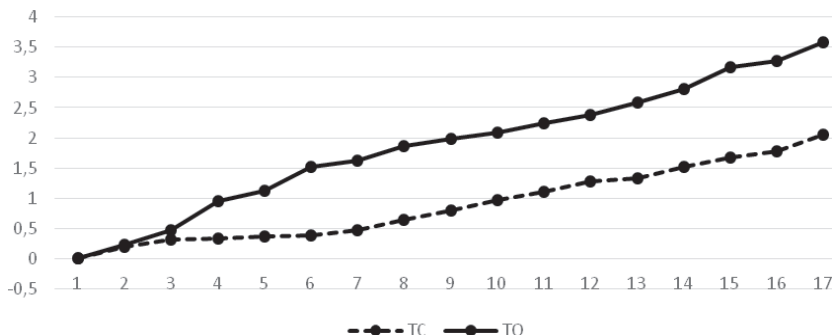


Figura 1. Media genética estimada por generación para tasa de ovulación (TO) y tamaño de camada (TC) en un experimento de selección por tasa de ovulación durante 6 generaciones y por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada durante 10 generaciones.

En el segundo periodo, con la selección por niveles independientes para TO y TC durante 10 generaciones se incrementó tanto la tasa de ovulación (2,0 óvulos) como el tamaño de camada (1,7 gazapos). La respuesta en tamaño de camada ha sido mayor a la estimada en los experimentos de selección directa por tamaño de camada en conejos que es aproximadamente de 0,10 gazapos/generación (Mocé y Santacreu, 2010). La mejora del tamaño de camada en este experimento se debe a la mejora de los dos componentes del tamaño de camada: la tasa de ovulación y la supervivencia prenatal (+7,7%). La respuesta correlacionada en supervivencia prenatal se debió principalmente a un aumento de la supervivencia embrionaria (+3,5%). La supervivencia fetal, que había disminuido en el primer periodo, apenas se modificó al seleccionar por tasa de ovulación y tamaño de camada. Ruiz-Flores y Johnson (2001) propusieron la selección por niveles independientes por tasa de ovulación y tamaño de camada como una forma de mejorar la capacidad uterina (supervivencia prenatal que depende de la madre) y que se expresa cuando la tasa de ovulación es elevada. La mejora de la supervivencia embrionaria obtenida en este experimento estaría de

acuerdo con los resultados de un experimento de selección divergente por capacidad uterina en conejo; las diferencias en capacidad uterina entre las líneas se debieron principalmente a diferencias en supervivencia embrionaria y no en supervivencia fetal (Santacreu et al., 2005).

Por tanto, la selección por niveles independientes por tasa de ovulación y tamaño de camada aumenta tanto la tasa de ovulación como la supervivencia embrionaria y mejora la respuesta obtenida en tamaño de camada por selección directa.

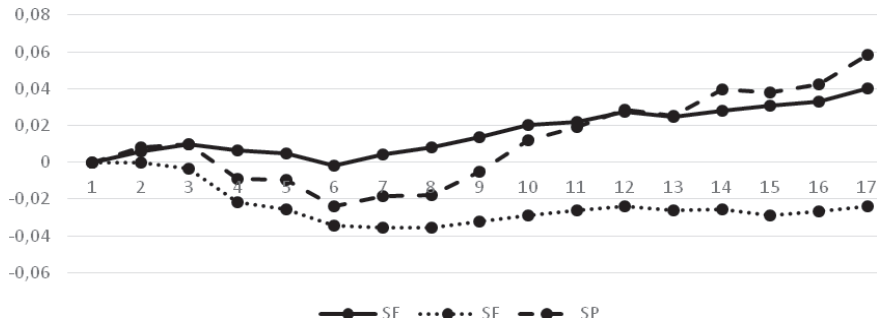


Figura 2. Media genética estimada por generación para supervivencia embrionaria (SE), fetal (SF) y prenatal (SP) en un experimento de selección por tasa de ovulación durante 6 generaciones y por niveles independientes para tasa de ovulación y tamaño de camada durante 10 generaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford G.E. 1969. Genetics 61: 905-921.
- Freking B.A., Leymaster K.A., Vallet J.L., Christenson R.K. 2007. J. Anim. Sci. 85: 2093-2103
- Groeneveld E. 1994. 5th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. 22: 47.
- 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.

SELECTION FOR OVULATION RATE AND LITTER SIZE IN RABBITS. CORRELATED RESPONSE ON PRENATAL SURVIVAL.

ABSTRACT: Two-stage selection for ovulation rate (OR) and litter size (LS) was performed during 10 generations using a rabbit line previously selected during 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 1275 females were analyzed.

After 6 generations of selection for ovulation rate, it increased around 1.6 ova but the correlated response on LS was low (0.5 kits). However, after 10 generations of selection by the index, OR and LS increased around 2 ova and kits, respectively. Correlated response on prenatal survival was observed (+7.7%) mainly due to an increase in embryo survival (+3.5%).

Keywords: rabbit, litter size, ovulation rate, prenatal survival.

RESPUESTA A LA SELECCIÓN POR GRASA INTRAMUSCULAR DEL LOMO EN CONEJO Y RESPUESTAS CORRELACIONADAS EN OTROS MÚSCULOS.

Martínez-Álvaro, M.¹ Juste, V., Blasco, A. y Hernández, P.

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València. Apartado de correos 22012.46071 Valencia. mamaral9@upv.es

INTRODUCCIÓN

La importancia de la grasa intramuscular (IMF) en la calidad de la carne está bien establecida. Se han realizado diversos experimentos de selección por IMF, como por ejemplo el de Schwab et al. (2004) en cerdos y Zhao et al. (2007) en pollos. No hay mucha información sobre las respuestas correlacionadas a la selección por contenido en IMF en caracteres de calidad de carne y en particular en contenido en IMF de diversos músculos. El objetivo de este trabajo es estudiar las respuestas correlacionadas en contenido en IMF de músculos de distinto metabolismo tras seis generaciones de selección divergente por IMF en *Longissimus dorsi* (LD) en conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se usaron 111 conejos procedentes de la sexta generación de un experimento de selección divergente por contenido en IMF del músculo LD a las 9 semanas de edad, definido en Martínez-Álvaro et al. (2014). Los conejos fueron criados en jaula colectiva desde el destete hasta el momento del sacrificio y alimentados *ad libitum* con una dieta comercial. Se sacrificaron 30 conejos de la línea seleccionada por alta IMF (H) y 30 de la línea seleccionada por baja IMF (L) a las 9 semanas de edad, mientras que 26 de la H y 25 de la L se sacrificaron a las 13 semanas de edad. Tras el sacrificio las canales se refrigeraron a 4°C durante 24 horas. Se registraron los pesos de la canal. Se diseccionaron y pesaron la grasa escapular (SF), la grasa perirrenal (PF) y los músculos LD, *Bíceps femoris* (BF), *Supraspinatus* (SSP) y *Semimembranosus propius* (SMP) y se midió el pH de los músculos. El LD, el BF y el SSP se picaron, liofilizaron y analizaron por NIRS para la determinación de la IMF (Zomeño et al., 2012). En el músculo SMP la IMF se determinó por Soxtec debido a su pequeño tamaño.

La respuesta a la selección por IMF del LD y las respuestas correlacionadas en el peso de la canal, peso de los depósitos grasos y IMF de los músculos se estimaron como las diferencias entre las líneas H y L a 9 y 13 semanas. El modelo empleado incluyó los efectos de sexo, línea y edad. Se realizó un análisis bayesiano de los datos. Se estimaron las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre líneas mediante Gibbs sampling. Se utilizaron priors planos acotados para todos los efectos y varianzas. Los detalles del procedimiento están descritos en Sorensen y Gianola (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los músculos LD, BF, SSP y SMP se eligieron en base a sus distintas características fisicoquímicas, tal y como se describe en Delmas y Ouhayoun (1990). La Tabla 1 muestra los parámetros descriptivos de los caracteres medidos a 9 y a 13 semanas. El LD presentó los valores de pH e IMF más bajos mientras que el SMP presentó los valores de pH e IMF más altos, de acuerdo a su distinto metabolismo.

El peso de los depósitos grasos y el contenido en IMF en todos los músculos aumentaron con la edad, particularmente en el caso del SMP.

En la Tabla 2 se muestran la respuesta a la selección por IMF en LD y las respuestas correlacionadas en peso de la canal, peso de los depósitos grasos e IMF en los distintos músculos. Se tomó un tercio de la desviación típica fenotípica de cada carácter como una diferencia relevante entre líneas y se calculó la probabilidad de que la diferencia sobrepasara dicho valor (Pr). La respuesta a la selección por IMF en LD a las 9 semanas en la quinta generación fue de 0,23g/100g, representando el 28% de la media del carácter (Martínez-Álvaro et al., 2014). En este estudio, la diferencia en IMF en LD entre las líneas a 9 semanas fue de 0,32 g/100g, que representa un 31% de la media del carácter. A las 13

semanas de edad, la diferencia fue de 0,70g /100g, representando un 49% de la media del carácter a 13 semanas. Ambas diferencias mostraron una Pr de 1.00. Varios estudios han tenido éxito al seleccionar por IMF (Schwab et al., 2009 en porcino y Zhao et al., 2007 en broilers).

La línea H tuvo un peso de la canal a las 9 semanas mayor que la línea L, pero no se observaron diferencias a 13 semanas. Schwab et al. (2009) no obtuvieron ninguna respuesta correlacionada en peso a la canal al seleccionar por IMF en LD en cerdos, sin embargo Zhao et al. (2007) observaron un aumento en peso a la canal de broilers seleccionados para incrementar el IMF en la pechuga.

Los depósitos grasos de la canal mostraron una respuesta correlacionada positiva a la selección. El peso de SF fue mayor en la línea H a 9 semanas, no obteniéndose diferencias a 13 semanas. La diferencia entre las líneas H y L en peso de PF, que es el mayor depósito graso en conejos, fue de 2,38 g a 9 semanas y de 9,48 g a 13 semanas. No obstante, los pesos de los depósitos PF y SF representaron 0,8% y 0,5% del peso de la canal a 9 semanas, y 1,4% y 0,5% del peso de la canal a las 13 semanas. Por lo tanto, el aumento observado en la línea H no constituye un gran deterioro de la canal. Los experimentos de selección por IMF del LD realizados por los autores Schwab et al. (2009), Ros Freixedes et al. (2014) y Zhao et al. (2007) también mostraron respuestas correlacionadas positivas en los depósitos grasos.

Las respuestas correlacionadas en IMF en los músculos BF, SSP y SMP fueron positivas y relevantes. Las diferencias en IMF entre líneas a 9 semanas fueron de 22% en BF y SSP y 23% en SMP respecto a la media. Todas las diferencias entre líneas aumentaron con la edad. A 13 semanas, las diferencias en IMF entre líneas fueron de 28% en BF, 28% en SSP y de 33% en SMP, respecto a la media. Este estudio muestra evidencias de que la selección por IMF en LD provoca respuestas correlacionadas positivas en IMF en otros músculos de metabolismos diferentes. En broilers, el contenido en IMF en muslo también aumentó al seleccionar por IMF en la pechuga (Zhao et al., 2007). En cerdos, se estimó una correlación genética alta y positiva entre el contenido en IMF de los músculos LD y *Gluteus medius* (Ros Freixedes et al., 2014).

No se observaron efectos de sexo en ninguno de los caracteres analizados.

CONCLUSIÓN

La selección divergente por contenido en IMF en LD a 9 semanas mostró una diferencia entre las líneas H y L de 0,32 g/100g, que representa un 31% de la media del carácter. El incremento en IMF en LD ha provocado un aumento del contenido en IMF en músculos de metabolismos diferentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Delmas, D. et al., 1990. Viandes et Produits Carnés.
- Martínez-Álvaro, M. et al. 2014. 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, Vancouver.
- Ros-Freixedes, R. et al. 2014. J.Anim.Sci 92:5417-5425.
- Schwab, C.R. et al. 2009. J.Anim.Sci. 87:2774-2780.
- Sorensen D. & Gianola, D. 2002. Springer, Nueva York, USA.
- Zhao, G.P. et al. 2007. Poult. Sci. 86:2309-2314.
- Zomeño, C. 2010. J. Anim.Sci 88:3419-3427.

Agradecimientos: Este experimento ha sido subvencionado por el proyecto AGL2011-29831-C03-01 del Plan Nacional de Investigación. Marina Martínez agradece su beca FPI (BES-2012-052655) al Ministerio de Economía y Competitividad.

RESPONSE TO SELECTION FOR INTRAMUSCULAR FAT CONTENT AND CORRELATION RESPONSES IN OTHER MUSCLES IN RABBITS.

ABSTRACT: A divergent selection experiment for intramuscular fat content (IMF) in *Longissimus dorsi* muscle (LD) in rabbits was carried out during 6 generations. Direct and correlated responses in carcass weight, scapular and perirenal fat weight and IMF of LD, *Biceps femoris*, *Supraspinatus* and *Semimembranosus propius* at 9 and 13 weeks of age were estimated as the differences between lines. Perirenal and scapular fat weights and IMF

of all muscles increased with age. Response to selection for IMF was successful. The difference between high and low lines in IMF of LD at 9 weeks was 0.32g/100g, representing a 30.4% of the mean. A positive correlated response was shown in IMF of all studied muscles. Selection for IMF showed a positive correlated response with fat deposits.

Keywords: intramuscular fat, rabbits, correlated responses in muscles.

Tabla 1. Parámetros descriptivos de los caracteres a las 9 y a las 13 semanas de edad.

	9 semanas		13 semanas	
	Media	SD	Media	SD
CCW ¹ (g)	932	88	1518	104
SF ² (g)	4,30	2,16	7,72	2,23
PF ³ (g)	7,18	2,91	20,92	8,76
LD ⁴ pH	5,69	0,09	5,76	0,12
BF ⁵ pH	5,79	0,09	5,87	0,12
SSP ⁶ pH	6,18	0,15	6,30	0,18
SMP ⁷ pH	6,35	0,12	6,40	0,13
LD IMF ⁸ (g/100g)	1,05	0,21	1,43	0,39
BF IMF (g/100g)	2,02	0,55	2,61	0,73
SSP IMF (g/100g)	2,06	0,42	2,95	0,71
SMP IMF (g/100g)	2,59	0,58	4,24	1,02

¹CCW, peso de la canal fría; ²SF peso de la grasa escapular; ³PF peso de la grasa perirrenal; ⁴LD, músculo *Longissimus dorsi* (LD); ⁵BF, músculo *Biceps femoris* (BF); ⁶SSP, músculo *Supraspinatus* (SSP); ⁷SMP, músculo *Semimembranosus propius* (SMP); ⁸IMF, contenido en grasa intramuscular.

Tabla 2. Respuesta a la selección por grasa intramuscular (IMF) en el *Longissimus dorsi* (LD) expresado en g/100g y respuestas correlacionadas en peso a la canal (g), peso de los depósitos grasos (g) e IMF (g/100g) en otros músculos a 9 y a 13 semanas de edad.

	9 semanas				13 semanas			
	¹ D _{H-L}	² HPD _{95%}	³ P	⁴ Pr	¹ D _{H-L}	² HPD _{95%}	³ P	⁴ Pr
CCW ⁵	81,6	[33,2, 126,5]	1,00	0,99	12,6	[-40,2, 63,6]	0,69	0,21
SF ⁶	1,64	[0,51, 2,75]	1,00	0,94	0,23	[-0,99, 1,41]	0,65	0,20
PF ⁷	2,38	[-0,32, 5,06]	0,96	0,85	9,48	[6,62, 12,38]	1,00	1,00
LD IMF	0,32	[0,25, 0,40]	1,00	1,00	0,70	[0,61, 0,78]	1,00	1,00
BF ⁸ IMF	0,45	[0,18, 0,74]	1,00	0,97	0,74	[0,43, 1,05]	1,00	1,00
SSP ⁹ IMF	0,46	[0,21, 0,71]	1,00	0,99	0,82	[0,54, 1,08]	1,00	1,00
SMP ¹⁰ IMF	0,60	[0,29, 0,94]	1,00	0,99	1,39	[1,03, 1,74]	1,00	1,00

¹D_{H-L}, mediana de la distribución marginal posterior de las diferencias entre las líneas alta y baja; ²HPD_{95%}, región de alta densidad posterior al 95% de probabilidad; ³P, probabilidad de D_{H-L} de ser mayor que 0 cuando D_{H-L} >0 y de ser menor que 0 cuando D_{H-L} <0, ⁴Pr, probabilidad de D_{H-L} de ser mayor que r cuando D_{H-L} >0 y de ser menor que r cuando D_{H-L} <0, siendo r 1/3 de la SD fenotípica del carácter; ⁵CCW, peso de la canal fría; ⁶SF, peso de la grasa escapular; ⁷PF, peso de la grasa perirrenal; ⁸BF; *Biceps femoris*; ⁹SSP; *Supraspinatus*; ¹⁰SMP; *Semimembranosus propius*.

EFFECTO DE LA SELECCIÓN DIVERGENTE POR GRASA INTRAMUSCULAR EN CARACTERES DE METABOLISMO LIPÍDICO EN CONEJO.

Martínez-Álvaro, M¹., Agha, S., Juste, V., Blasco, A. y Hernández, P.

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València. Apartado de correos 22012.46071 Valencia. mamaral9@upv.es

INTRODUCCIÓN

El contenido en grasa intramuscular (IMF) es un factor principal en calidad de carne. La deposición lipídica en el músculo depende de un balance entre flujos de ácidos grasos anabólicos (lipogénesis) y catabólicos (oxidación y transporte intracelular). Zomeño et al. (2010) observaron que las actividades lipogénicas y catabólicas estaban relacionadas con la deposición lipídica en conejos. Se ha realizado un experimento de selección divergente por IMF del músculo *Longissimus dorsi* (LD) con el fin de obtener dos líneas que difieran solamente en su contenido en IMF en LD y en los caracteres correlacionados. El objetivo de este estudio es analizar la actividad lipogénica y catabólica en dos músculos de diverso metabolismo (LD y *Semimembranosus propius* (SMP)) y en la grasa perirrenal (PF) de las líneas seleccionadas por alto (H) y bajo (L) contenido en IMF.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales de este estudio pertenecieron a la quinta generación de un experimento de selección divergente por contenido en IMF en el músculo LD, descrito en Martínez-Álvaro et al. (2014). Se tomaron 110 conejos, de los cuales 62 se sacrificaron a las 9 semanas (32 de la línea H y 30 de la línea L) y 48 a las 13 semanas (24 de la línea H y 24 de la línea L). Tras el sacrificio, se diseccionaron los músculos LD, SMP y el depósito PF. Las muestras se pesaron, se envasaron al vacío, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su análisis.

Las actividades de las enzimas lipogénicas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima málico (EM) y ácido graso sintasa (FAS) fueron medidas en LD, SMP y PF. Las actividades enzimáticas se expresaron en nmol de NADPH formado (G6PDH, EM) u oxidado (FAS) por minuto y por gramo de músculo. Las actividades de las enzimas catabólicas β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HAD), citrato sintasa (CS) y lactato deshidrogenasa (LDH) fueron analizadas en los músculos LD y SMP. Las actividades enzimáticas se expresaron como μ mol de NADH (HAD, LDH) o de ion mercaptido (CS) transformados por minuto y gramo de músculo. Todas las actividades enzimáticas se midieron según los métodos descritos en Zomeño et al. (2010).

El modelo empleado incluyó los efectos de sexo, línea y edad. Se realizó un análisis bayesiano de los datos. Se estimaron las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre líneas mediante Gibbs sampling. Se utilizaron priors planos acotados para todos los efectos y varianzas. Los detalles del procedimiento están descritos en Sorensen y Gianola (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media de contenido en IMF en LD en la quinta generación a 9 semanas de edad fue de 1,08 g/100g. La respuesta a la selección por IMF en LD fue simétrica y la diferencia entre las líneas H y L en la quinta generación fue de 28% respecto de la media del carácter (Martínez-Álvaro et al., 2014).

En la Tabla 1 se muestran los parámetros descriptivos de las actividades enzimáticas medidas en el LD, SMP y PF. El músculo SMP presentó mayor actividad lipogénica G6PDH y FAS y menor actividad de EM que LD, tal y como observaron Zomeño et al. (2010). La PF mostró mayor actividad G6PDH y FAS y menor actividad EM que ambos músculos.

En todos los tejidos estudiados, la actividad lipogénica aumentó a las 13 semanas. Zomeño et al. (2010) también encontraron un aumento de la actividad lipogénica con la edad en el músculo SMP de conejos, aunque no encontraron diferencia en el músculo LD.

En la Tabla 2 se muestran las características de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre líneas en actividades enzimáticas a las 13 semanas de edad. Las

diferencias a 9 semanas resultaron pequeñas en todas las actividades medidas y no se muestran en la tabla. La línea H mostró mayor actividad lipogénica en LD y SMP que la línea L. En PF la línea H presentó mayor actividad de las enzimas G6PDH y FAS y menor actividad de la EM que la línea L. Las diferencias entre líneas en actividad lipogénica del LD pueden asociarse a la selección por IMF. La selección por IMF en LD tuvo una respuesta correlacionada positiva en IMF del SMP y en el peso de PF tal y como se muestra en Martínez-Álvaro et al. (2015).

El músculo LD presentó mayor actividad glicolítica (LDH), mientras que el SMP mostró mayor actividad oxidativa (HAD y CS) (Tabla 1), como era de esperar debido a su diferente metabolismo y composición fibrilar (Gondret et al., 2004). Además, el LD mostró mayor actividad glicolítica a las 13 semanas que a las 9, pero no se observaron diferencias en la actividad oxidativa con la edad. Hernández et al. (2004) también observaron en conejos un incremento en el metabolismo glicolítico con la edad. El SMP presentó menor actividad oxidativa a 13 semanas que a 9, sin cambios en su actividad glicolítica.

La línea H mostró mayor actividad glicolítica en el LD (Tabla 2), y menor actividad oxidativa en el SMP a 13 semanas de edad. No se observó un efecto de sexo en ninguna actividad enzimática.

CONCLUSIÓN

La actividad catabólica y lipogénica de los músculos LD y SMP está influenciada por su metabolismo. La actividad lipogénica aumentó con la edad en los músculos LD, SMP y en el depósito PF. La selección por contenido en IMF en LD provoca cambios en la actividad lipogénica y catabólica a las 13 semanas de edad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gondret, F. et al. 2004 *Reprod. Nutr. Dev.* 44:1–16.
- Hernández et al. 2004 *J.Anim. Sci.* 82:3138–3143.
- Martínez-Álvaro, M. et al. 2014. 10thWCGALP, Vancouver
- Martínez-Álvaro, M. et al. 2015. XVI Jornadas Prod. Anim. AIDA
- Sorensen D. & Gianola, D. 2002. Springer, Nueva York, USA.
- Zomeño, C. et al. 2010 *J.Anim.Sci.* 88:3419-3427.

Agradecimientos: Este experimento ha sido subvencionado por el proyecto AGL2011-29831-C03-01 del Plan Nacional de Investigación. El Dr. Saif Agha en la Universidad Politécnica de Valencia fue subvencionado por una beca de la Comisión Europea EMMAG, del programa Erasmus Mundus, Action 2.

EFFECT OF DIVERGENT SELECTION FOR INTRAMUSCULAR FAT ON LIPID METABOLISM TRAITS IN RABBITS

ABSTRACT: A program of divergent selection for intramuscular fat (IMF) in the *Longissimus dorsi* muscle (LD) in rabbits was carried out. Difference in IMF between high (H) and low (L) lines after 5 generations was a 27.7 % of the mean at 9 weeks of age. Enzymes activities involving lipid metabolism of two muscles (*Semimembranosus propius* (SMP) and LD) and perirenal fat (PF) were studied in H and L lines at 9 and 13 weeks. Bayesian inference was used. Muscle SMP showed higher G6PDH and FAS lipogenic activities and higher oxidative activities than LD, while LD showed a greater glycolytic activity. Lipogenic activities increased with age in all studied tissues. Differences between H and L lines were detected for lipogenic and catabolic activities at 13 weeks but not at 9 weeks. Greater lipogenic activities in SMP, LM and PF were observed in H line compared to L line. Line H had higher glycolytic activity in LD and lower oxidative activity in SMP than L line. Our results indicate that lipogenic and metabolic activities are influenced by the metabolism of each muscle. Differences in lipogenic and oxidation activities between H and L lines can be attributed to the selection for IMF.

Keywords: Lipogenic and catabolic enzymes, bayesian inference, intramuscular fat.

Tabla 1. Parámetros descriptivos de las actividades enzimáticas lipogénicas¹ y catabólicas² medidas en *Longissimus dorsi* (LD), *Semimebranosus propius* (SMP) y grasa perirrenal (PF) a las 9 y 13 semanas de edad.

		9 semanas			13 semanas		
		Media	SD	n	Media	SD	n
LD	G6PDH	118	28	56	127	28	40
	EM	485	161	60	744	200	40
	FAS	12,7	5,1	23	17,4	6,2	21
	LDH	862	176	40	1130	253	40
	HAD	1,42	0,37	39	1,46	0,40	39
	CS	3,41	0,61	41	3,54	0,97	40
SMP	G6PDH	297	106	55	425	120	35
	EM	391	83	60	415	95	40
	FAS	61,4	18,6	39	88,1	25,5	31
	LDH	46,4	14,8	46	47,4	13,1	46
	HAD	2,78	0,61	46	2,63	0,58	45
	CS	5,39	0,86	46	5,08	0,94	46
PF	G6PDH	766	218	40	957	309	34
	EM	172	71,0	58	249	88,8	40
	FAS	260	70,2	33	313	85,0	32

¹Actividades de las enzimas lipogénicas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), málico (EM) y ácido graso sintasa (FAS) expresadas en nanomoles/min y gr de tejido. ²Actividades de las enzimas catabólicas β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HAD), citrato sintasa (CS) y lactato deshidrogenasa (LDH) expresadas en micromoles/min y gr de tejido.

Tabla 2. Características de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre líneas¹ en actividades enzimáticas lipogénicas² y catabólicas³ medidas en *Longissimus dorsi* (LD), *Semimebranosus propius* (SMP) y grasa perirrenal (PF) a las 13 semanas de edad.

		D _{H-L}	HPD _{95%}	P	k _{80%}
LD	G6PDH	29,5	[12,1, 47,2]	1,00	22,0
	EM	100	[-8,00, 217]	0,96	53,3
	FAS	8,50	[-2,05, 19,4]	0,94	4,03
	LDH	-42,2	[-184, 91,4]	0,73	
	HAD	0,08	[-0,16, 0,34]	0,74	
	CS	-0,01	[-0,50, 0,54]	0,50	
SMP	G6PDH	75,4	[0,30, 149,5]	0,97	43,4
	EM	32,3	[-25,5, 86,7]	0,87	7,6
	FAS	16,4	[0,20, 32,3]	0,98	9,7
	LDH	2,46	[-5,57, 11,17]	0,73	
	HAD	-0,22	[-0,59, 0,13]	0,88	-0,07
	CS	-0,5	[-1,01, 0,05]	0,96	-0,27
PF	G6PDH	152	[-37,7, 335]	0,94	68,9
	EM	-37,8	[-83,5, 12,1]	0,94	-17,8
	FAS	55,4	[2,2, 111]	0,98	31,8

¹D_{H-L}, mediana de la distribución marginal posterior de las diferencias entre las líneas alta (H) y baja (L); HPD_{95%}, región de alta densidad posterior al 95% de probabilidad; P, probabilidad de D_{H-L} de ser mayor que 0 cuando D_{H-L}>0 y menor que 0 cuando D_{H-L}<0; k_{80%}, límite del intervalo [k, +∞) cuando D_{H-L}>0 y (-∞, k] cuando D_{H-L}<0. ²Actividades de las enzimas lipogénicas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), málico (EM) y ácido graso sintasa (FAS) expresadas en nanomoles/min y gr de tejido. ³Actividades de las enzimas catabólicas β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HAD), citrato sintasa (CS) y lactato deshidrogenasa (LDH) expresadas en micromoles/min y gr de tejido.

SIETE GENERACIONES DE SELECCIÓN DIVERGENTE PARA LA VARIABILIDAD DEL PESO AL NACIMIENTO EN RATONES

Formoso-Rafferty, N.¹, Ibáñez-Escriche, N.², Gutiérrez, J.P.¹ y Cervantes, I.¹

¹Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. Email: gutgar@vet.ucm.es

²Genética i Millora Animal, IRTA, 25198 Lleida, Spain

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de la homogeneidad ha sido propuesta como una forma de mitigar los efectos negativos que la selección tradicional para aumentar la producción pudiera haber tenido sobre otras funciones de los animales (Bolet et al., 2007). Producciones más homogéneas, se asocian además con mayores rentabilidades (Bolet et al., 2007) y mejora en el bienestar animal (Damgaard et al. 2003; Bodin et al., 2010; Mormede y Terenina, 2012). Por lo tanto, considerar los programas de selección por homogeneidad incide por un lado en aspectos económicos del sector agro-ganadero como en el bienestar animal. Aunque se han estimado parámetros genéticos relativos a la variabilidad en varias poblaciones animales (Hill y Mulder, 2010), existen muy pocos resultados exitosos de procesos de selección artificial para modificar la variabilidad ambiental. El objetivo de este trabajo fue analizar la tendencia genética después de 7 generaciones de selección divergente para variabilidad del peso al nacimiento (PN) en el ratón de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos se obtuvieron tras siete generaciones de un experimento de selección divergente para PN en ratones a partir de una población preexistente de tres líneas consanguíneas de ratones: BALB/c, C57BL y CBA y mantenida en panmixia durante más de 40 generaciones.

Se tomaron inicialmente 60 hembras y 60 machos al azar y se aparearon obteniéndose dos camadas de cada cruce. Para establecer las líneas se hizo una evaluación genética y se simuló un apareamiento escogiendo cuatro machos y cuatro hembras descendientes de cada una de las 10 mejores hembras por su valor genético aditivo más alto o más bajo para variabilidad ambiental del PN, para crear respectivamente las líneas de alta y baja variabilidad. A partir de la segunda generación se repitió el proceso durante seis generaciones adicionales. Para maximizar la respuesta, y con ayuda de un procedimiento de "simulated annealing" (Fernández y Toro, 1999), se permitió que los mejores animales dejaran más descendencia maximizando la respuesta siempre que el parentesco medio de la descendencia no superase el de la solución simulada anteriormente.

Se utilizaron 9.422 registros de PN pertenecientes a 984 camadas de 638 hembras y todo el pedigrí incluyendo 10 generaciones atrás con un total de 8.592 animales.

Los PN fueron asignados a la madre. El modelo empleado para realizar la valoración genética fue el propuesto por SanCristobal et al. (1998) en el que se asume que la varianza ambiental es heterogénea y parcialmente bajo control genético:

$$y_i = \mathbf{x}_i' \mathbf{b} + \mathbf{z}_i' \mathbf{u} + \mathbf{w}_i' \mathbf{c} + e^{\frac{1}{2}(\mathbf{x}_i' \mathbf{b} + \mathbf{z}_i' \mathbf{u} + \mathbf{w}_i' \mathbf{c})} \varepsilon_i$$

Siendo y_i el valor del carácter para el individuo i . El asterisco (*) identifica los efectos ajustados para analizar la variabilidad ambiental, \mathbf{b} y \mathbf{b}^* son los vectores asociados con los efectos sistemáticos generación (7 niveles), tamaño de camada (de 2 a 17, 16 niveles) y sexo (macho, hembra, desconocido), \mathbf{u} y \mathbf{u}^* los vectores asociados con el efecto genético directo de la madre (8,592 niveles) y \mathbf{c} y \mathbf{c}^* los vectores asociados con el segundo efecto aleatorio, el efecto camada (984 niveles). \mathbf{x}_i , \mathbf{z}_i y \mathbf{w}_i son los vectores de incidencia para los efectos fijos, animal, y camada respectivamente. Para los vectores \mathbf{u} y \mathbf{u}^* se asumen distribuciones normales con:

$$\begin{pmatrix} \mathbf{u} \\ \mathbf{u}^* \end{pmatrix} | \sigma_u^2, \sigma_{u^*}^2, \mathbf{A}, \rho \sim N \left(\begin{pmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} \sigma_u^2 & \rho \sigma_u \sigma_{u^*} \\ \rho \sigma_u \sigma_{u^*} & \sigma_{u^*}^2 \end{pmatrix} \otimes \mathbf{A} \right)$$

donde \mathbf{A} es la matriz de relaciones genéticas aditivas, σ_u^2 es la varianza genética aditiva del carácter y $\sigma_{u^*}^2$ es la varianza genética aditiva afectando a la varianza ambiental del carácter, ρ es el coeficiente de correlación genética y \otimes denota el producto de Kronecker. Los vectores \mathbf{c} y \mathbf{c}^* se asumen también independientes, con $\mathbf{c} | \sigma_c^2 \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I}_c \sigma_c^2)$ y $\mathbf{c}^* | \sigma_{c^*}^2 \sim$

$N(\mathbf{0}, \mathbf{I}_c \sigma_c^2)$, siendo \mathbf{I}_c la matriz identidad de orden igual al número de niveles del segundo efecto aleatorio y $\sigma_{c_y}^2$ y σ_c^2 las componentes de varianza asociadas al efecto camada. Siguiendo este modelo se realizó una valoración genética con el programa GSEVM (Ibáñez-Escriche et al., 2010). Se analizaron las tendencias genéticas promediando el valor genético (PBV) dentro de cada línea y generación tanto para el PN como para su variabilidad ambiental. Asimismo, el PN, así como su desviación estándar (Std) y su coeficiente de variación (CV) se analizaron con un modelo fijo $y_i = \mathbf{x}_i \mathbf{b} + e_i$, en el que y_i representan PN, Std o CV, incluyendo como efectos sistemáticos la línea*generación (15 niveles), el tamaño de camada (16) y en el caso de PN el sexo (3). La distribución posterior de la diferencia entre líneas dentro de generación, se utilizó para explorar signos de respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evolución de los PBV para el carácter y su variabilidad ambiental por generación en ambas líneas se muestran en la Figura 1. Se observa una evolución divergente aproximadamente lineal en la variabilidad ambiental como la consecuencia lógica de la selección realizada. También se observa una evolución genética divergente para PN como consecuencia de la correlación genética positiva estimada entre PN y su variabilidad ambiental (0,26). Sin embargo, la tendencia observada para PN en la línea de baja variabilidad parece más o menos estable.

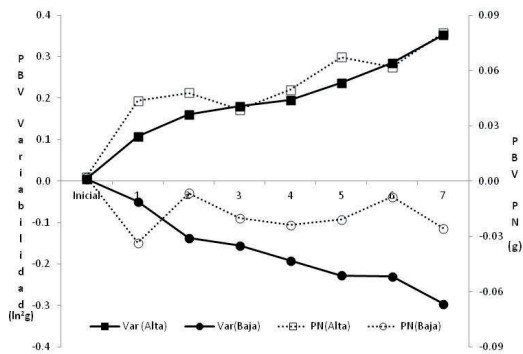


Figura 1. Evolución de los valores genéticos promedio (PBV) para el carácter peso al nacimiento (PN) y su variabilidad ambiental por generación en ambas líneas.

En la Figura 2 se muestra la evolución de las medias del PN y de la Std por línea y generación. Se observa también una tendencia divergente aunque algo irregular. Las diferencias (D) de estos dos caracteres entre líneas dentro de generación se muestran en la Tabla 1 junto con su desviación estándar, el intervalo posterior mayor del 95% y la probabilidad de que $D > 0$ de la distribución marginal posterior de D.

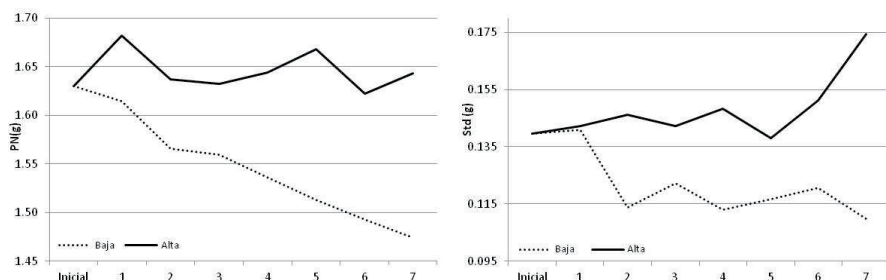


Figura 2. Evolución de las medias del peso al nacimiento (PN) y de la desviación típica (Std) por línea y generación.

La selección llevada a cabo cada generación parece tener un comportamiento diferente. Estas tendencias irregulares se deben a la respuesta en el valor genético aditivo de la madre para el PN y su variabilidad, pero pueden existir otras razones causantes de variabilidad que por ejemplo, conlleven el nacimiento de un individuo anormalmente pequeño. La respuesta fue siempre de alguna manera concluyente, con una clara divergencia en el inicio y mantenimiento o menos divergencia posteriormente, al igual que en otros experimentos similares. Tal es el caso de las cuatro generaciones de selección para variabilidad ambiental del PN en conejos (Garreau et al., 2008) o para varianza residual de tamaño de camada en conejos (Argente et al., 2012).

Tabla 1. Media (D), Desviación típica (Std), Intervalo posterior mayor del 95% (HPD_{95%}) y probabilidad de D>0 (P%) de la distribución marginal posterior de la diferencia entre líneas por generación para la desviación típica del peso al nacimiento (SD) y del peso al nacimiento (PN).

	Generacion 1	Generacion 2	Generacion 3	Generacion 4	Generacion 5	Generacion 6	Generacion 7	
SD	D	0,003	0,032	0,019	0,033	0,019	0,025	0,064
	Std	0,009	0,010	0,010	0,009	0,009	0,009	0,009
	HPD _{95%}	(-0,015 <> 0,021)	(0,012 <> 0,05)	(0,000 <> 0,037)	(0,014 <> 0,051)	(0,001 <> 0,037)	(0,006 <> 0,044)	(0,046 <> 0,083)
	P%	63%	100%	97%	100%	98%	100%	100%
PN	D	0,075	0,060	0,059	0,086	0,116	0,049	0,115
	Std	0,010	0,011	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
	HPD _{95%}	(0,055 <> 0,095)	(0,039 <> 0,08)	(0,039 <> 0,078)	(0,066 <> 0,106)	(0,096 <> 0,136)	(0,029 <> 0,069)	(0,095 <> 0,135)
	P%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argente, M.J., García, M.L., Muelas, R. & Blasco, A. 2012. 10th World Rabbit Congress, Sharm El-Sheikh, Egypt.
- Bodin, L., Bolet, G., Garcia, M., Garreau, H., Larzul, C. & David, I. 2010. INRA Prod. Anim. 23: 11-22.
- Bolet, G., Gaffeau, H., Joly, T., Theau-Clement, M., Faheres, J., Hurtaud, J. & Bodin, L. 2007. Livest. Sci. 111: 28-32.
- Damgaard, L., Rydhmer, L., Lovendahl, P. & Grandinson, K. 2003. J. Anim. Sci. 81: 604-610.
- Fernández, J. & Toro, M. 1999. J. Anim. Breed. Genet. 116: 447-466.
- Garreau, H., Bolet, G., Larzul, C., Robert-Granie, C., Saleil, G., SanCristobal, M. & Bodin, L. 2008. Livest. Sci. 119: 55-62.
- Hill, W.G. & Mulder, H.A. 2010. Genet. Res. 92: 381-395.
- Ibáñez-Escriche, N., García, M. & Sorensen, D. 2010. J. Anim. Breed. Genet. 127: 249-251.
- Mormede, P. & Terenina, E. 2012. Domest. Anim. Endocrin. 43: 116-131.
- SanCristobal-Gaudy, M., Eisen, J., Bodin, L. & Chevalet, C. 1998. Genet. Sel. Evol. 30: 423-451.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la ayuda (AGL2008-00794).

GENETIC RESPONSE IN DIVERGENT EXPERIMENT SELECTION IN ENVIRONMENTAL VARIABILITY FOR BIRTH WEIGHT IN MICE

ABSTRACT: The aim of the genetic selection in animal breeding has traditionally been the increase in the mean of the productive traits. Selection for less sensitivity with respect to environmental effects as indicated by a low variation around the optimum trait value has benefits in the productivity and in the animal welfare and it is already and will be in the future one of the main targets of selection. The aim of this research was to analyse the genetic trend during seven generations of a divergent selection for environmental variance for birth weight in mice. A model assuming a heterogeneous environmental variance and partially under genetic control was used. The phenotypic variances of the birth weight across generations showed differences between the high and low variability lines. Genetic control of the birth weight environmental variability seems to be possible in mice.

Keywords: birth weight, canalisation, selection experiment, mice

ANÁLISIS BAYESIANO PARA LA DETECCIÓN DE HUELLAS DE SELECCIÓN EN POBLACIONES DE VACUNO DE CARNE ESPAÑOL

González-Rodríguez, A.¹, Munilla, S., Mouresan, E.F., Cañas-Álvarez, J. J., Baro, J. A., Molina, A., Díaz, C., Piedrafita, J., Altarriba, J. y Varona, L.

¹Grupo de Genética Cuantitativa y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. Calle Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España. aldemar@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Los procesos de selección y adaptación pueden dejar huellas en la estructura del genoma de las poblaciones. En la literatura, se han descrito un gran número de procedimientos para la detección de esta huella (Qanbari y Simianer, 2014), tanto basados en el espectro de frecuencias como en la longitud de los haplotipos. Otros procedimientos, como el F_{ST} , tienen su fundamento en la comparación entre las frecuencias alélicas de cada población. En este mismo sentido, Vitalis et al. (2014) ha propuesto un nuevo método (SelEstim), basado en un enfoque bayesiano, que permite distinguir entre los polimorfismos seleccionados y casi neutros, bajo un modelo genético que asume una población dividida en varias subpoblaciones entre las que puede existir migración.

El objetivo de este estudio es utilizar este procedimiento para localizar regiones genómicas asociadas a la selección en siete poblaciones de vacuno de carne Español (Asturiana de los Valles –AV–, Avileña-Negra Ibérica –ANI–, Bruna dels Pirineus –BP–, Morucha –Mo–, Pirenaica –Pi– and Retinta –Re–, Rubia Gallega –RG–).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se dispuso de un total de 171 tríos (padre/madre/descendiente) de siete poblaciones de vacuno de carne español (AV, n=25; ANI, n=24; BP, n=25; Mo, n=25; Pi, n=24; Re, n=24; RG, n=24). Los padres fueron escogidos con el objetivo de capturar la mayor variabilidad existente entre las razas. Tras un control de calidad estándar se utilizaron 703.707 SNPs. Las fases de los cromosomas de los padres se establecieron por medio del software BEAGLE (Browning y Browning, 2009).

SelEstim: El procedimiento de Vitalis et al. (2014) asume un modelo Bayesiano jerárquico que permite distinguir el polimorfismo seleccionado desde un fondo neutral (o casi neutral) y estima la intensidad de selección para cada alelo y población. El modelo asume que los alelos cuentan en cada loci con dos estados (A y a), cuya distribución estadística es:

$$L(p_{ij}; n_{ij}) = \binom{n_{ij}}{x_{ij}} p_{ij}^{x_{ij}} (1-p_{ij})^{n_{ij}-x_{ij}}$$

Donde p_{ij} es la frecuencia alélica del estado A , x_{ij} es el número de alelos en estado A y n_{ij} es el número total de alelos para el $j^{\text{ésimo}}$ loci en la $i^{\text{ésima}}$ población. Además, asume una distribución a priori de p_{ij} a partir de una densidad estacionaria en un proceso de difusión (Vitalis et al., 2014):

$$\Psi(p_j; M_j, \sigma_{ij}, k_j, \pi_j) = C^{-1} \exp(\sigma_{ij} p_j) p_j^{M_j \pi_j - 1} (1 - p_j)^{M_j (1 - \pi_j) - 1}$$

Donde M_j es la escala de parámetros de migración ($M_j = 4N_j m_j$), π_j es la frecuencia de los alelos en toda la población, $\sigma_{ij} = 2N_j s_{ij}$ es la escala del coeficiente de selección en la población i en el locus j y k_j es un indicador variable que toma valores de 0 si el alelo A es seleccionado y 1 si el alelo a es seleccionado para el $j^{\text{ésimo}}$ locus en la $i^{\text{ésima}}$ población. La distribución a priori para k_j es una Bernoulli (Ber (0,5)), para π_j es una Beta (1,1) y para M es una log-uniforme (0,001 a 10.000). También se asume la siguiente distribución a priori: $f(\sigma_{ij} | \delta_j) \sim \exp(\delta^{-1})$, siendo δ_j un hiperparámetro que representa el efecto medio de la selección en el locus j sobre todas las poblaciones. En una jerarquía anterior, se postula una distribución exponencial a priori para

$f(\delta_j|\Lambda) \sim \exp(\Lambda^{-1})$, y $f(\Lambda) \sim \exp(\Lambda^{-1})$ con $\Lambda=1,0$. Este modelo se implementó mediante un método de MCMC con el software de acceso público SELESTIM (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/selestim/>).

Identificación de regiones genómicas: Se identificaron como señales significativas las regiones que presentaron más de 10 SNPs con una señal superior al 0,01% para el parámetro asociado a selección (δ) y dentro de una ventana de 1 Mb. Posteriormente, se utilizó la base de datos ENSEMBL (Flicek, et al., 2013) para localizar genes candidatos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El parámetro de migración (M) tiene una media posterior (Desviación típica) de 61,42 (0,21) para la raza AV, mientras que para el resto de las poblaciones tuvo un rango entre 16,46 (Pi) y 28,17 (Mo). Este resultado nos indica una mayor relación de la población AV con el resto. Este resultado concuerda con el obtenido por Cañas-Álvarez et al. (2014) mediante análisis de clúster con ADMIXTURE.

En la Figura 1 se presentan los resultados del parámetro δ_j , a lo largo de los autosomas bovinos y en la Tabla 1 se presenta la lista de regiones genómicas que presentan señales relevantes para al menos 10 SNPs y un δ_j mayor a 14,99 dentro de una región de 1Mb, además, en esta tabla se presentan los valores de σ_{ij} , y k_{ij} para el marcador de máxima señal en cada una de las poblaciones.

Los resultados de este procedimiento son similares a los obtenidos por González-Rodríguez et al. (2014), mediante el estadístico F_{ST} . Las regiones que involucran un mayor número de marcadores están localizadas en BTA2 (5,2-10,6 Mb), BTA5 (17,3-19,8 Mb), BTA6 (37,9-41,4 Mb), BTA11 (67,0-67,5 Mb) y BTA18 (13,4-16,5 Mb), y además, también presentan una señal de mayor intensidad de selección (32,066 - BTA2 -, 29,985 - BTA5 -, 29,968 - BTA6 -, 19,443 - BTA11 -, 25,403 - BTA18 -).

Algunas de estas regiones tienen asociado un gen candidato evidente como en BTA2 (*MTSN-Myostatin*), BTA5 (*KITLG-KITLigand*) y BTA18 (*MC1R-Melanocortin1 receptor*). Por el contrario, las regiones localizadas en los cromosomas BTA6 y BTA11 pueden estar asociadas a varios genes de interés. La región genómica del BTA6 ha sido asociada a multitud de caracteres de interés (Saatchi et al., 2014) y en ella se encuentran los genes *LAP3* (*Leucine aminopeptidase3*), *NCAPG* (*Non-SMC condensing I complex, subunit G*), *LOCRL* (*Ligand dependent nuclear receptor corepressor-like*) *ABCG2* (*ATP-binding cassette sub-family G member 2*) y *PPARG1A* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*). Por otra parte, en la región del BTA11, se localizan los genes *PROKR1* (*Prokineticin receptor 1*), *GFPT1* (*Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1*), *GMCL1* (*Germ cell-less spermatogenesis associated 1*), *PCBP1* (*Poly (rC) binding protein 1*) y *EHD3* (*EH-domain containing 3*), asociados a fertilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Qanbari, S. & Simianer, H. 2014. *Livestock Science*, 116:133–143.
- Vitalis, R. et al. 2014. *Genetics*, 196:799–817.
- Browning, B. L., & Browning, S. R. 2009. *Am. J. Hum. Genet.* 84:210-223.
- Cañas-Álvarez, J. et al. 2014. 10th WCGALP.
- González-Rodríguez, A. et al. 2014. 10th WCGALP.
- Flicek, P., Ahmed, I., Amode, M. R. et al. 2013. *Nucleic Acid. Res.* 41(D1): D48-D55.
- Saatchi, M., et al. 2014. *BMC Genomics* 15:442.

Agradecimientos: Este estudio ha sido posible gracias al apoyo financiero de AGL2010-15903. González-Rodríguez A y Cañas J. J. disfrutaron de las becas BES-2011-045434 y COLCIENCIAS Francisco José de Caldas 497/2009, respectivamente.

Tabla 1. Valores de $\sigma_{ij}(k_{ij})$ para marcadores de máxima señal en regiones genómicas con un δ mayor a 14,99 y un número superior a 10 SNPs.

Cr	Posición (Mb)	Nº Marcadores	Delta Max. (δ)	AV	ANI	BP	Mo	Pi	Re	RG
2	5,2-10,6	222	32,066	136,36 (0,026)	92,17 (0,995)	52,15 (0,970)	92,32 (0,994)	49,07 (0,985)	69,81 (0,991)	25,49 (0,227)
5	17,2-19,8	63	29,985	59,84 (0,018)	46,17 (0,890)	216,22 (0,000)	35,03 (0,809)	38,97 (0,001)	45,48 (0,881)	24,60 (0,050)
5	47,0-47,1	18	18,683	57,38 (0,998)	15,08 (0,338)	68,34 (1,000)	26,53 (0,188)	9,35 (0,632)	24,08 (0,182)	18,03 (0,894)
5	70,1-70,2	11	16,010	14,37 (0,326)	8,57 (0,624)	42,49 (0,004)	68,67 (0,995)	6,79 (0,552)	13,39 (0,837)	19,14 (0,077)
6	31,9-31,9	12	18,534	15,12 (0,420)	51,48 (1,000)	32,25 (0,106)	76,82 (1,000)	9,21 (0,425)	16,61 (0,934)	15,23 (0,264)
6	36,5-41,3	100	29,968	29,01 (0,721)	77,17 (0,009)	148,26 (0,999)	61,81 (0,029)	21,85 (0,925)	76,64 (0,006)	47,81 (0,985)
7	47,2-47,7	17	18,874	14,27 (0,462)	16,29 (0,899)	58,86 (0,999)	41,16 (0,995)	22,07 (0,078)	60,65 (0,007)	9,44 (0,445)
11	66,9-70,8	51	19,443	25,56 (0,328)	14,99 (0,077)	82,31 (1,000)	43,73 (0,105)	43,12 (0,886)	10,46 (0,336)	14,09 (0,468)
13	57,5-57,7	11	18,442	16,61 (0,307)	9,08 (0,589)	43,10 (0,007)	19,70 (0,878)	10,65 (0,190)	83,75 (0,999)	33,08 (0,018)
18	13,3-16,3	111	25,403	18,48 (0,565)	81,47 (1,000)	43,15 (1,000)	96,51 (1,000)	25,02 (0,104)	53,94 (0,024)	35,10 (0,074)

Cr (Cromosoma), AV (Asturiana de los Valles), ANI (Avileña-Negra Ibérica), BP (Bruna dels Pirineus), Mo (Morucha), Pi (Pirenaica), Re (Retinta), RG (Rubia Gallega).

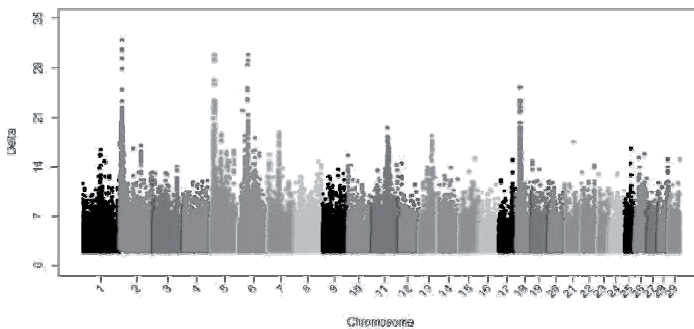


Figura 1. Resultados del efecto medio de la selección (delta)

BAYESIAN ANALYSIS TO DETECTING SELECTION FOOTPRINTS IN THE SPANISH POPULATIONS OF BEEF CATTLE

ABSTRACT: The BovineHD 770K BeadChip was used on 171 triplets (sire/dam/offspring) from seven Spanish local beef cattle breeds (Asturiana de los Valles, Avileña-Negra Ibérica, Morucha, Bruna dels Pirineus, Pirenaica, Retinta and Rubia Gallega). The parents were chosen to be as unrelated as possible. We use the software SELESTIM to identify loci targeted by a selection process and also to estimate the strength and the allele of selection within each subgroup. This approach showed five genomic regions with maximum signal, some of these have a clear candidate gene as BTA2 (*MTSN-Myostatin*), BTA5 (*KITLG-KITLigand*) and BTA18 (*MC1R-Melanocortin1 receptor*); while the located in BTA6 and BTA11 can be associated with several genes.

Keywords: Beef cattle, Selection footprint, Genomic regions, Bayesian analysis.

DETECCIÓN DE HUELLAS DE SELECCIÓN UTILIZANDO EL RADIO ESPECTRAL DE LA MATRIZ DE COANCESTRÍA MOLECULAR

Munilla¹, S., González-Rodríguez, A., Mouresan, E. F., Moreno, C., Altarriba, J. y Varona, L.

¹Grupo de Genética Cuantitativa y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. Calle Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España. Ivarona@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de marcadores moleculares ha revolucionado la mejora genética animal (véase, por ejemplo, la revisión de Dekkers y Hospital, 2002). Entre sus aplicaciones más recientes, el empleo de SNPs con el fin de detectar huellas de selección se ha posicionado como una alternativa valiosa en la búsqueda de genes asociados a caracteres productivos o adaptativos en especies domésticas. Las huellas de selección se definen como patrones distintivos de variación en secuencias de ADN, atribuibles a procesos de selección natural o artificial. En este contexto, los métodos de detección de huellas de selección constituyen una colección de procedimientos estadísticos que ponen a prueba la hipótesis de que la variabilidad observada puede explicarse perfectamente por procesos neutrales de mutación y deriva. En general, estos métodos asumen que las secuencias de marcadores que se utilizan para construir el estadístico provienen de una muestra aleatoria de individuos. En poblaciones animales, sin embargo, los individuos suelen estar emparentados entre sí y, en tal caso, sus genomas no son independientes. Si bien es técnicamente posible evitar el muestreo de individuos emparentados, esta situación puede restringir el tamaño de la muestra y afectar así la potencia de la prueba de hipótesis. Como alternativa, en este trabajo se presenta un método de detección de huellas de selección fundamentado en una matriz de parentescos genómicos. La ventaja de este enfoque radica en que la matriz de parentescos genómicos contempla las relaciones de parentesco entre individuos desde su construcción y, en consecuencia, permitiría relajar el supuesto de muestreo aleatorio de individuos. Más específicamente, la propuesta se basa en calcular una norma matricial, denominada *radio espectral*, a partir de la matriz de parentescos genómicos de una región previsiblemente sujeta a un proceso de selección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Considérese una mutación favorable que experimenta una fuerte presión de selección, aumentando su frecuencia hasta reemplazar por completo el alelo ancestral, un proceso denominado barrido alélico (*'selective sweep'*, en inglés). Desde el punto de vista de la genética de poblaciones, un barrido alélico produce un patrón de variación en torno a la posición seleccionada diferente al esperado bajo neutralidad (Walsh y Lynch, 2011). Los métodos de detección de huellas de selección explotan estas diferencias para poner a prueba la hipótesis de neutralidad a través de estadísticos cuyo valor es particularmente sensible a los patrones de variación observados.

En este trabajo nos concentramos en los efectos de un barrido alélico sobre la coancestría molecular en torno a la región seleccionada. En general, las regiones genómicas muestran gran variación en términos de parentesco. Si bien en parte esto es consecuencia de la naturaleza estocástica de los mecanismos hereditarios, las fuerzas evolutivas que afectan a los individuos de una población también contribuyen al fenómeno (Weir et al., 2005). En particular, un barrido alélico aumenta la coancestría molecular en la región de influencia respecto a un proceso neutral porque el haplotipo que contiene la mutación favorable se halla más representado en la población y, en consecuencia, es más probable que dos alelos tomados al azar resulten idénticos por descendencia. Argumentando a la inversa, un 'exceso' de parentesco en una región específica del genoma puede interpretarse como una huella de selección. Para dos individuos en la población, la coancestría molecular se define como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar, uno de cada uno de ellos, sean idénticos en estado (Toro et al., 2011). Este concepto se aplica a un locus en particular, pero puede extenderse a una región de interés promediando los valores de los marcadores que hay en ella. En este estudio, los valores de coancestría molecular obtenidos para cada par de individuos en la población se arreglaron en una matriz de coancestría molecular.

Para comparar diferentes matrices de coancestría molecular es conveniente recurrir a un estadístico que resuma en un único valor la información contenida. Las normas matriciales constituyen una alternativa ideal para este propósito, dado que extienden el concepto de

distancia vectorial a espacios multidimensionales (Golub y Van Loan, 1996). El estadístico elegido para este estudio fue el denominado radio espectral, cuyo valor se corresponde con la norma-2 en el caso de matrices simétricas. El radio espectral es equivalente al máximo valor propio, en términos absolutos, de una matriz. Además de su facilidad de cómputo, una propiedad importante de este estadístico es que su valor es menor o igual a cualquier otra norma de la misma matriz.

Para evaluar la potencia estadística de un test de neutralidad basado en el radio espectral de la matriz de coancestría molecular en una región de interés se desarrolló un experimento de simulación estocástica. Primero, se simuló una genealogía de secuencias de marcadores moleculares bialélicos en una población. Una vez alcanzado el equilibrio mutación-deriva, se seleccionó a favor de una mutación causal durante diez generaciones. Para construir la hipótesis nula, también se replicó la genealogía sin selección. La potencia se calculó superponiendo las distribuciones empíricas del estadístico en ambas situaciones (selección vs neutralidad) bajo diferentes escenarios poblacionales, que se obtuvieron modificando los siguientes parámetros: intensidad de selección, densidad de SNPs, frecuencia del alelo derivado al comienzo de la selección y tamaño de muestra (Tabla 1). Por último, los resultados fueron comparados contra dos métodos clásicos de detección de huellas de selección: la prueba de Tajima (1989) y el estadístico rEHH (del inglés 'relative extended haplotype homozygosity', Sabeti et al., 2002). Para llevar adelante los cálculos se escribieron programas específicos en Fortran 90 y R (R Core Team, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la prueba de potencia se presentan en la Figura 1. Cada barra representa la potencia estadística del método de detección de huellas de selección, calculada a partir de la distribución del estadístico en 5.000 réplicas de la genealogía. En el caso del estadístico rEHH, fue necesario determinar previamente el marcador *base* ('core', Sabeti et al., 2002). Para ello, se seleccionó aquel SNP de la región que maximizaba la potencia estadística en un análisis de ventanas deslizantes. En términos generales, la potencia estadística de la prueba de Tajima (1989) fue baja para todos los escenarios simulados (en torno a 0,2 – 0,4), al menos para el tamaño de muestra de referencia (50 individuos). Resultados similares fueron reportados por Simianer et al. (2014) en un estudio comparativo de diferentes métodos de detección de huellas de selección aplicados a ganado doméstico. Bajo un enfoque de coalescencia, Simonsen et al. (1995) observaron que la prueba de Tajima sólo tiene potencia estadística en una ventana acotada de tiempo, que seguramente no captura el escenario de referencia. Por su parte, la prueba de hipótesis basada en el estadístico rEHH mostró mayor potencia estadística en general, con valores por encima de 0,6 para la mayoría de los escenarios simulados. Este método evalúa la caída del desequilibrio de ligamiento en la región circundante al marcador (o haplotipo) bajo selección (Sabeti et al., 2002). Los métodos basados en este enfoque también manifestaron una mayor potencia estadística en el estudio comparativo de Simianer (2014).

El método alternativo propuesto en este trabajo, basado en el radio espectral de la matriz de coancestría molecular construida a partir de un conjunto de marcadores moleculares en torno a la región de interés, superó en potencia a la prueba de Tajima (1989) en todos los escenarios simulados. En cambio, la potencia estadística sólo fue mayor a la de la prueba rEHH en situaciones puntuales, especialmente con una baja frecuencia de la mutación favorecida al comienzo de la selección y una fuerte presión de selección subsiguiente. Se concluye que el método propuesto es comparativamente útil para detectar un barrido alélico, particularmente cuando éste es intenso.

Tabla 1. Parámetros y rango de los valores utilizados para representar diferentes escenarios poblacionales. Valores de referencia en negrilla.

Parámetro	Rango de valores
Intensidad de selección (definida a través de coeficientes en contra del genotipo 11/12/22)	Débil- (1,0/0,8/0,8); Débil+ (1,0/0,5/0,5); Fuerte- (1,0/0,5/0,2); Fuerte+ (1,0/0,5/0,0)
Densidad de marcadores (SNP × cM ⁻¹)	200; 400 ; 1000
Rango de frecuencia del alelo seleccionado	0,1–0,2 ; 0,2–0,3; 0,4–0,5; 0,5–0,6; 0,6–0,7
Tamaño de muestra (2 × tamaño efectivo)	100 ; 200; 400

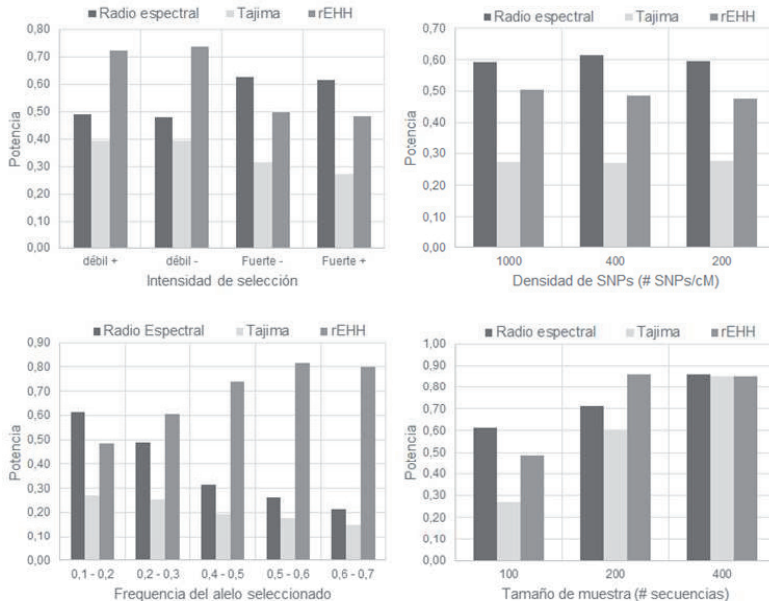


Figura 1. Potencia estadística de los métodos de detección de huellas de selección bajo los diferentes escenarios poblacionales ensayados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Dekkers & Hospital. 2002. *Nature Rev. Genet.* 3: 22–32 • Golub & Van Loan. 1996. *Matrix Computations*. 3ra edición • R Core Team. 2014. URL: <http://www.R-project.org/> • Sabeti et al. 2002. *Nature* 419: 832–837 • Simianer et al. 2014. Proc. 10th WCGALP • Simonsen et al. 1995. *Genetics* 141: 413–429 • Tajima, F. 1989. *Genetics*. 123: 585–95 • Toro et al. 2011. *Genet. Sel. Evol.* 43:27 • Walsh & Lynch. 2011. *Evolution and Selection of Quantitative Traits*. Draft. • Weir et al. 2005. *Genome Res.* 15:1468–76.

Agradecimientos: S. Munilla agradece el financiamiento recibido con cargo al proyecto FITE 2012/2013 para el grupo DGA A51.

DETECTING SIGNATURES OF SELECTION BY MEANS OF THE SPECTRAL RADIUS OF THE MOLECULAR COANCESTRY MATRIX

ABSTRACT: In this study we introduce the spectral radius of the molecular coancestry matrix, computed for an enclosed set of contiguous markers, as a selection signature test. We emphasize that this test is useful when the sampled individuals are related (a typical situation in animal breeding) as compared to other tests that rest on the assumption that sampled sequences are randomly drawn. This is because the genomic relationship matrix intrinsically accounts for relatedness by construction. We explore the statistical power of the spectral radius test versus other standard neutrality tests through a stochastic simulation study under several population scenarios. We found that the test based in the spectral radius outperformed the Tajima’s test in all the scenarios assayed. In turn, the power was only greater than the one obtained with the rEHH statistic for certain specific situations, noticeably when the frequency of the causal mutation at the start of the selection is low and subsequent selection intensity is strong. We conclude that the method is comparatively useful to detect intense selective sweeps.

Keywords: hard sweep, molecular coancestry, matrix norms, statistical power.

PATRONES INTRACROMOSÓMICOS DE CONSANGUINIDAD Y PARENTESCO EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE VACUNO LECHERO

Kleinman-Ruiz, D.¹, Villanueva, B.¹, Fernández, J.¹, Toro, M. A.², García-Cortés, L. A.¹ y Rodríguez-Ramilo, S. T.¹

¹ Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, Crta. A Coruña Km. 7.5, 28040, Madrid. ² Dpto. Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 28040, Madrid. jmj@inia.es

INTRODUCCIÓN

Las estimas más recientes de censo efectivo en la raza Holstein son del orden de 100 animales (Rodríguez-Ramilo et al., 2014). Sin embargo, este número era del orden de decenas de miles, o más, en la época que siguió a la domesticación del vacuno (Hill, 2010). Tales descensos en el censo efectivo y los incrementos en las tasas de consanguinidad y parentesco son consecuencia de una selección artificial intensa y continuada durante muchas generaciones, en conjunción con la inseminación artificial y la transferencia de embriones (Brotherstone y Goddard, 2005). Por ello, la estimación de consanguinidad y parentesco resulta de enorme interés en el caso de esta raza.

La bibliografía reciente recoge varios trabajos en los que se demuestra que las estimas genómicas de consanguinidad y parentesco obtenidas a partir de los chips de SNPs son más precisas que las obtenidas a partir de información genealógica (Keller et al., 2011). Mientras que las medidas genealógicas son valores esperados como promedio para el genoma en su conjunto, las medidas moleculares son valores realizados. Otro aliciente de los marcadores moleculares es que si son suficientemente densos, permiten estimar consanguinidad mucho más antigua que las genealogías. Además, una ventaja adicional que tienen los chips de SNPs es que nos permiten rastrear patrones intracromosómicos de consanguinidad y parentesco y poder así contrastar si la diversidad se distribuye uniformemente o no a lo largo de los cromosomas.

El objetivo del presente estudio es evaluar los patrones de consanguinidad y parentesco a partir de SNPs a lo largo del genoma en la población española de vacuno lechero. Además, se evalúa el efecto de la selección artificial sobre estos patrones. Para ello se comparan los valores de consanguinidad y parentesco en 100 animales nacidos entre los años 1960 y 1979 con los valores obtenidos en 100 animales nacidos en el año 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis genómico se dispuso de los genotipos de SNPs, proporcionados por CONAFE, de 11.135 individuos pertenecientes a la población de referencia utilizada para las evaluaciones genómicas del vacuno Holstein en España. Los animales fueron genotipados utilizando el Illumina BovineSNP50™ BeadChip (versiones v1 y v2). Se seleccionaron aquellos SNPs comunes a ambos chips (52.340), pero de éstos se excluyeron todos aquellos SNPs no mapeados (523) y todos aquellos mapeados en los cromosomas X e Y (1.056) según la versión UMD 3.0 del ensamblaje del genoma de vacuno. Por último, también fueron excluidos 14.068 SNPs y 566 animales por tener al menos un 5% de genotipos faltantes. Así, los datos que finalmente se emplearon en los análisis incluyeron un total de 36.693 SNPs y 10.569 animales nacidos entre 1960 y 2013.

De forma análoga a la definición de parentesco de Malécot (1948), el parentesco molecular entre dos individuos i y j (f_{Mij}) es la probabilidad de que, dado un locus concreto, dos alelos tomados al azar (uno de cada individuo) sean iguales; es decir, idénticos en estado (IBS). El cociente f_{Mij} se calculó en nuestros datos como

$$f_{Mij} = (1/n_s) \sum_{s=1}^{n_s} \left[\left(\sum_{k=1}^2 \sum_{m=1}^2 I_{s_{k,m}} \right) / 4 \right]$$

donde n_s es el número de SNPs incluidos en el análisis e $I_{s_{k,m}}$ es la identidad del alelo k del individuo i con el alelo m del individuo j en el SNP s , y toma un valor igual a 1 si los alelos son idénticos, o igual a 0 en caso contrario. De manera análoga, la consanguinidad

molecular del individuo i (F_{Mi}) es la probabilidad de que, dado un locus concreto, los dos alelos portados por dicho individuo sean IBS. El coeficiente de consanguinidad del individuo i fue calculado como $F_{Mi} = 2f_{Mi} - 1$.

Con el fin de identificar patrones genómicos de F_M y f_M a lo largo del genoma, se dividió cada autosoma en ventanas deslizantes de aproximadamente 5 Mb, y se estimaron los F_M y f_M promedio considerando solo los SNPs localizados en cada ventana. Concretamente, para definir la primera ventana deslizante de cada cromosoma se tomaron todos los SNPs desde el extremo del mismo hasta el primero que sobrepasase los 5 Mb. A continuación, y manteniendo constante el número de SNPs de la ventana, ésta se fue desplazando un SNP hacia la derecha hasta alcanzar el extremo final del cromosoma. El promedio del número de SNPs por ventana y cromosoma fue 70,76.

El análisis de ventanas deslizantes se realizó con todos los individuos genotipados (10,569). Además, se compararon los patrones genómicos de F_M y f_M de 100 individuos nacidos entre el año 1960 y el año 1979 con 100 individuos nacidos en el año 2013 para evaluar la evolución de estos parámetros en esta raza altamente seleccionada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1a representa el patrón de parentesco obtenido para el cromosoma 1. Se aprecia claramente que f_M no es uniforme a lo largo del cromosoma, sino que oscila ostensiblemente en torno a la media, distinguiéndose un pico con el parentesco más alto entre 80 y 90 Mb aproximadamente, y un valle con el parentesco más bajo entre 65 y 75 Mb. El patrón observado para F_M fue muy similar al observado para f_M tanto en el autosoma presentado como en los demás autosomas (resultados no mostrados). En la Figura 1b se muestran los patrones de parentesco en los 100 individuos nacidos entre 1960 y 1979 y en 100 animales nacidos en 2013 a lo largo del cromosoma 1. Las diferencias en parentesco en regiones cromosómicas específicas son claras. Distintas regiones genómicas muestran un mayor parentesco en los animales nacidos en el año 2013 que en los nacidos entre 1960 y 1979, lo cual podría indicar que estas regiones genómicas han sido sometidas a selección artificial.

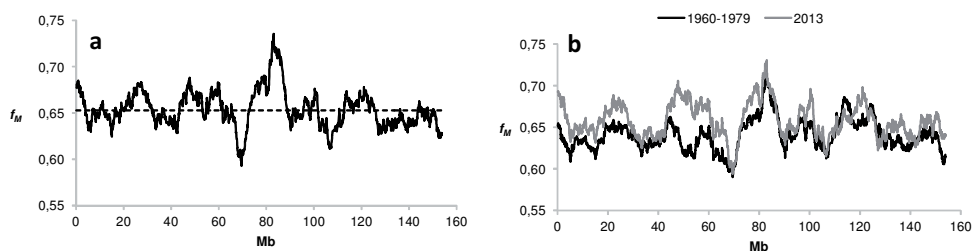


Figura 1. (a) Patrón de parentesco a lo largo del cromosoma 1 en el total de individuos. La línea discontinua representa el parentesco promedio para este cromosoma ($f_M = 0,653$). (b) Patrones de parentesco a lo largo del cromosoma 1 en 100 animales nacidos entre 1960 y 1979 (línea negra) y en 100 animales nacidos en 2013 (línea gris).

La Figura 2 representa la distribución de frecuencias de parentesco de los individuos analizados. Se observa que los individuos nacidos en 2013 presentan un parentesco medio mayor que los individuos nacidos entre 1960 y 1979. La naturaleza asimétrica de la distribución, sobre todo cuando se analizan todos los animales, pone de manifiesto regiones genómicas con mayor parentesco del esperado.

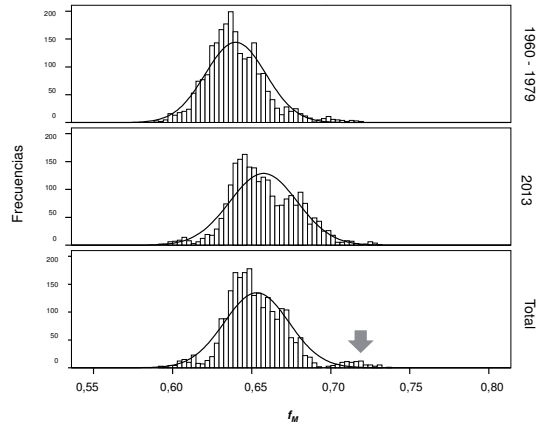


Figura 2. Distribución de frecuencias de los patrones de parentesco a lo largo del cromosoma 1. 1960 – 1979: 100 individuos nacidos entre 1960 y 1979. 2013: 100 individuos nacidos en 2013. Total: 10.569 animales nacidos entre 1960 y 2013.

Gracias a los paneles densos de SNPs se puede determinar qué regiones acumulan mayor o menor consanguinidad o parentesco. Se esperaría que regiones cercanas a QTLs que afectan a caracteres sometidos a selección direccional mostraran niveles de parentesco más altos que las regiones neutras. Además, las zonas genómicas con mayor parentesco en animales nacidos en 2013 que en los nacidos entre 1960 y 1979 pueden indicar regiones que han sido sometidas a selección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Brotherstone & Goddard, 2005. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 1479-1488. • Hill, 2010. *Philos. Trans. R. Soc. B* 365, 73-85. • Keller et al., 2011. *Genetics* 189, 237-249. • Malécot, 1948. Masson & Cie, Paris, Francia. • Rodríguez-Ramilo et al., 2014. 10th WCGALP, Vancouver, Canadá.

Agradecimientos: Los autores agradecen a EuroGenomics y a CONAFE los datos genotípicos que se han empleado en este estudio. Este trabajo estuvo integrado en un proyecto financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto CGL2012-39861-C02-02).

INTRA-CHROMOSOMAL PATTERNS OF INBREEDING AND COANCESTRY IN THE SPANISH POPULATION OF DAIRY CATTLE

ABSTRACT: In this study, genomic patterns of inbreeding and coancestry across the genome were obtained for the Spanish Holstein population. Animals were genotyped with the Illumina BovineSNP50 BeadChip. After applying filtering criteria, the genomic dataset included 36,693 autosomal SNPs and 10,569 animals. SNP-based inbreeding and coancestry at intra-chromosomal level was calculated using 5 Mb sliding windows. SNP-based measures show different patterns of inbreeding and coancestry on specific chromosome regions. Also, there were clear differences in patterns of inbreeding and coancestry between individuals born in 1960-1979 and individuals born in 2013. These differences could be useful for detecting selection signatures.

Keywords: Genome-wide information, Holstein, coancestry, inbreeding

NORMALIZACIÓN DE COEFICIENTES DE CONSANGUINIDAD BASADOS EN REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD

Gomez-Raya, L., Rodríguez, C., Barragán, C. y Silió, L.

Departamento de Mejora Genética Animal

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

Ctra. de La Coruña km 7, 28040 Madrid

INTRODUCCIÓN

Un coeficiente de consanguinidad es una estima puntual de la cantidad de apareamientos entre ancestros relacionados genéticamente de un individuo. Los coeficientes genealógicos de consanguinidad, definidos como la probabilidad de que los dos alelos de un locus de un individuo sean idénticos por descendencia (Crow y Kimura, 1970), han sido de uso generalizado. Los avances en tecnologías genómicas permiten un conocimiento más profundo de la autocigosidad, que podría proporcionar una mayor información de la magnitud de las relaciones genéticas entre los ancestros de un individuo. Existen diferentes medidas de autocigosidad, basadas en marcadores moleculares, que permiten estimar el nivel de consanguinidad de un individuo o población. El primero de los estadísticos basado en información molecular fue la proporción de posiciones monomórficas a nivel individual (Toro et al., 2009). El valor esperado de esta medida empírica de similaridad es una función de la consanguinidad genealógica, que es fácil de estimar utilizando información molecular (Van Raden, 2008; Toro et al., 2011). Sin embargo, estos estadísticos ignoran los SNPs ligados ubicados en el mismo cromosoma cuyos haplotipos se heredan como una unidad. El apareamiento entre parientes conlleva a la herencia de fragmentos de cromosomas o Regiones de Homocigosidad (ROH) que son idénticos por descendencia y no simples SNP individuales distribuidos a lo largo del genoma. Por lo tanto, se podrían utilizar ROH para estimar a nivel genómico la autocigosidad (Keller et al., 2011; Pemberton et al., 2012). La idea inicial fue separar ROH de acuerdo a su longitud, y asociar la proporción del genoma cubierta por los ROH mas largos a la consanguinidad reciente. Por ejemplo, Ferencakovic et al. (2011) utilizó fragmentos de entre 1-2 Mb a >16 Mb de longitud para buscar la relación entre tamaño de ROH y consanguinidad reciente en vacuno. Los umbrales utilizados por estos autores no utilizan toda la información disponible sobre los ROH. Recientemente, Gomez-Raya et al. (2015) han propuesto nuevos coeficientes basados en la función de probabilidad de la longitud de ROH de un individuo. Sin embargo, la normalización propuesta por estos autores sólo obliga a los coeficientes de consanguinidad a estar entre 0 y 1, lo cual complica la comparación de coeficientes de consanguinidad de diferentes grupos, poblaciones o individuos si los datos de la distribución de la longitud de ROH de todas esas fuentes no están disponibles. En este estudio, proponemos un nuevo método de normalización de coeficientes genómicos de consanguinidad que no requiere comparaciones de la distribución de la longitud de ROH entre varias fuentes. El método se ilustra con estimaciones de consanguinidad genómica de 217 cerdas ibéricas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Gomez-Raya et al. (2015) propusieron la estimación de coeficientes de consanguinidad después de ajustar una distribución exponencial a la longitud de ROH de un individuo y a la distribución de todos los individuos de la población de referencia por

$$F_{ROH-E^m} = \frac{1}{\lambda_I-ROH} - \frac{1}{\lambda_A-ROH}$$

donde λ_{I-ROH} y λ_{A-ROH} son los parámetros después de ajustar una distribución exponencial a un individuo o a todos los individuos, respectivamente. Este método requiere el ajuste de las dos distribuciones a comparar: la del individuo y la de la población de referencia. Los nuevos coeficientes de consanguinidad normalizados utilizan la función de densidad acumulada de un individuo (o grupo) después de ajustar una distribución exponencial. De esta manera se puede calcular la probabilidad de que un ROH extraído al azar sea mayor o igual a un umbral predeterminado. Así, el coeficiente de consanguinidad normalizado se define como:

$$F_{E(T)} = F(T) = \int_T^{\infty} \lambda_{I-ROH} e^{-(\lambda_{I-ROH})x} d(x)$$

donde T es el umbral. Así pues, $F_{E(T)}$, estima el grado de autocigoidad de un individuo. El coeficiente normalizado de consanguinidad esta forzando a variar entre 0 y 1 debido a que esta definido como una probabilidad. El umbral es arbitrario pero comparaciones entre individuos (o grupos) es posible si se utiliza el mismo umbral. Los nuevos coeficientes fueron utilizados para estimar la consanguinidad de 217 cerdas de la estirpe Torbiscal de cerdo ibérico. Esta línea ha permanecido genéticamente cerrada entre 1963 y 2013 y su genealogía registrada se completa con la de sus ancestros desde 1944. Se comparó el coeficiente de consanguinidad genealógico (F_{ped}) con los nuevos coeficientes de consanguinidad utilizando un análisis de regresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La densidad kernel de la distribución de la longitud de ROH de todos los individuos se utilizó para decidir el umbral que podría ser usado en la derivación de los coeficientes normalizados genómicos de consanguinidad (Figura 1). Se tomó 1Mb como el umbral que podría representar el punto a partir del cual la autocigoidad podría diferir entre individuos. La regresión de los coeficientes genómicos de consanguinidad normalizados sobre los coeficientes de consanguinidad genealógicos se presentan en la Figura 2. El valor de la correlación fue 0,691 (SD=0,0493). Los dos coeficientes están bien correlacionados pero el coeficiente normalizado de consanguinidad es superior por la gran cantidad de información genómica utilizada en su estimación. Por otra parte, el coeficiente de consanguinidad genealógico no es capaz de tener en cuenta la segregación mendeliana y la posibilidad de herencia de fragmentos de autocigoidad por azar y representa simplemente una estima puntual de la probabilidad promedio de autocigoidad en el genoma. Por ejemplo, estos coeficientes no pueden estimar el nivel de consanguinidad por cromosoma. Además, los coeficientes genealógicos de consanguinidad son incapaces de comparar dos individuos no relacionados genéticamente pero que pertenecen a poblaciones diferentes. Los nuevos coeficientes de consanguinidad genómicos si que permiten la comparación de los niveles de consanguinidad entre individuos pertenecientes a poblaciones diferentes.

La conclusión de este trabajo es que los nuevos coeficientes de consanguinidad genómicos normalizados (definidos como la probabilidad de que un ROH extraído al azar de un individuo es mayor o igual a 1Mb), podría ser superior a los coeficientes genealógicos de consanguinidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Crow, J.F. & Kimura, M. 1970 An Introduction to Population Genetics Theory. New York: Harper and Row.
- Gomez-Raya, L., Rodríguez, C, Barragán, C. & Silió, L. Molecular inbreeding coefficients based on the distribution of the length of runs of homozygosity in a closed line of Iberian pigs. (enviado). 2015.
- Ferenčaković, M., Hamzić, E., Gredler, B., Solberg, T.R., Klemetsdal, G., Curik, I. & Sölkner, J.. 2013. Estimates of autozygosity derived from runs of homozygosity: empirical evidence from selected cattle populations. J. Anim. Breed. Genet 130: 286-293.
- Keller, M.C., Visscher, P.M., & Goddard, M.E. 2011. Quantification of inbreeding due to distant ancestors and its detection using dense SNP data. Genetics, 189: 237-249.
- Pemberton, T., Asher, D., Feldman, M.W., Myers, R.M., Rosenberg, N.A. & Li, J.Z. 2012. Genomic patterns of homozygosity in worldwide human populations. Amer J. Hum. Genet. 91(2): 275-292.
- Toro, M., Caballero, A. & Fernández, J. 2009. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. Livest. Sci. 120: 174–195.
- Toro, M., García-Cortés, L.A. & Legarra, A. 2011. A note on the rationale for estimating genealogical coancestry from molecular markers. Genet. Sel. Evol., 43: 27.
- Van Raden, P.M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. J. Dairy Sci. 91: 4414-4423.

Agradecimientos: Esta investigación fue financiada con el proyecto RTA2011-00113. Agradecemos los esfuerzos de Jaime Rodríguez y toda la plantilla del 'Dehesón del

Encinar' por el mantenimiento de los registros de pedigrí de la estirpe Torbiscal y sus ancestros hasta el cierre reciente de esta granja.

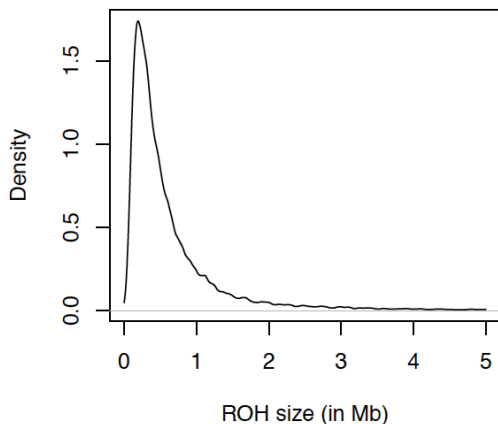


Figura 1. Kernel de densidad de la distribución de la longitud de ROH para todos los individuos (Numero de ROH = 299750, Bandwidth = 0,02935).

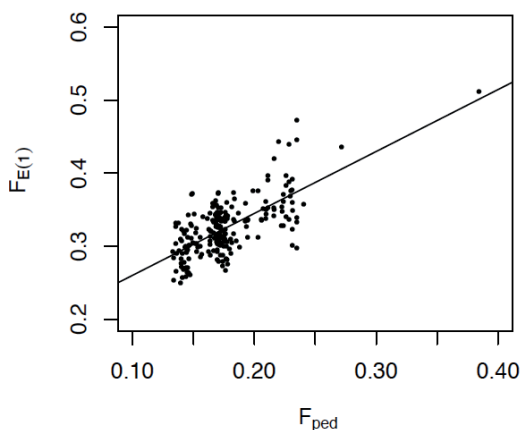


Figura 2. Regresión de los coeficientes de consanguinidad normalizados ($F_{E(1)}$) sobre los coeficientes de consanguinidad genealógicos (F_{ped}) para 217 cerdas ibéricas.

NORMALIZATION OF PARAMETRIC INBREEDING COEFFICIENTS BASED ON RUNS OF HOMOZYGOSITY

ABSTRACT: A new method for the estimation of normalized inbreeding coefficients based on the distribution of the length of Regions of Homozygosity (ROH) is proposed. The method is based on fitting an exponential distribution to the distribution of the length of ROH in order to estimate the probability that an ROH drawn at random from the distribution of that individual is greater or equal to a threshold (1Mb). The correlation between the normalized inbreeding coefficient and the pedigree inbreeding coefficient was 0.691 (0.0493). The novel normalized inbreeding coefficient could be superior to inbreeding coefficients based on pedigree information due to the use of all information from the distribution of ROH.

Keywords: *Runs of homozygosity, Inbreeding, Iberian pigs, Swine.*

HUELLA DE MÚLTIPLES INTROGRESIONES EN EL GENOMA MITOCONDRIAL DE LOS CERDOS DE ÁFRICA ORIENTAL

Noce, A., Amills¹, M., Manunza, A., Sánchez, A., Egbalsaied, S., Mercadé, A. y Masembe, C.

¹Department of Animal Genetics, Center for Research in Agricultural Genomics (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193. E-mail: marcel.amills@uab.cat.

INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha, se sabe muy poco de los orígenes de los cerdos africanos debido a la escasez de datos arqueológicos y genéticos. Se asume que la crianza de cerdos en el Este de África coincide con la llegada de los marineros portugueses (Blench, 2000). No obstante, el análisis de la variación genética del cromosoma Y en cerdos de Kenia y Zimbawe ha evidenciado la presencia de un haplotipo que segrega a elevada frecuencia en cerdos procedentes del este de Asia y que, en cambio, está prácticamente ausente en razas comerciales Europeas (Ramírez et al., 2009). Ello sugiere que la entrada de cerdos asiáticos en el este de África ocurrió en tiempos más o menos remotos, como consecuencia del antiguo comercio entre dicha región y China o bien, más recientemente, a través de las rutas comerciales que unían Macao con Portugal. El objetivo del presente estudio consiste en caracterizar la diversidad genética de los cerdos de Uganda para obtener una perspectiva más amplia sobre los orígenes de los cerdos de África Oriental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos recogido muestras biológicas correspondientes a 81 cerdos distribuidos en 14 regiones de Uganda. La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de pelo y sangre usando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen). Se amplificó un fragmento de 1250 pb usando dos primers (forward 5'CAA CCA AAA CAA GCA TTC CA3', reverse 5'GAT TGT GGG CGT ATG CTT AAA3') complementarios a la región mitocondrial D-loop. La reacción de purificación se hizo con el kit ExoSAP-IT PCR Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, CA) y la secuenciación mediante el kit "Big Dye Terminator Cycle Sequencing v1.1" (Applied Biosystems). La electroforesis capilar se llevó a cabo en un equipo ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias resultantes fueron alineadas con el programa Multalin (Corpet, 1988) y publicadas en Genbank (GenBank accession numbers KM597073-KM597153). En los análisis filogenéticos se incluyeron también 151 secuencias adicionales de *Sus scrofa* procedentes de Europa, Indonesia, Corea, Japón, China, Tailandia, Vietnam, India, Marruecos, Túnez, Kenia y Zimbabwe. Para estudiar las relaciones genéticas entre las distintas poblaciones, se empleó el software Network 4.6 (Bandelt et al., 1999), asumiendo una ratio de transversión/transición de 3:1. Cinco cerdos Ugandeses fueron analizados con el chip porcino 60K de Illumina mediante la metodología descrita por Manunza et al. (2013). Dichos datos fueron comparados con otros previamente publicados por Manunza et al. (2013), Ai et al. (2013), Burgos-Paz et al. (2013) y Goedbloed et al. (2013). Se efectuó un control de calidad con el programa Plink 2.0 empleando los mismos parámetros utilizados por Manunza et al. (2013). También se usó Plink para construir un gráfico de escalamiento multidimensional y se llevó a cabo un análisis de estructura poblacional con el programa Admixture1.23, de acuerdo a los métodos descritos por Manunza et al. (2013). Por otra parte, se amplificó y secuenció un fragmento del cromosoma Y correspondiente al intron1 del gen *Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y-linked (UTY)* en 18 verracos pertenentes a diferentes regiones de Uganda (Masaka, Bundibujjo, Luweero, Rakai, Mpigi, Lira, Gayaza, Amuru, Soroti), siguiendo el método descrito por Ramírez et al. (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis median-joining network sugiere que los cerdos de África Oriental poseen un origen muy complejo, con raíces no sólo en Oriente Lejano y Occidente (Europa / África del Norte), tal como ya describió Ramírez et al. (2009), sino también en la India. Así pues, en la Figura 1 puede verse como los cerdos de Uganda y Kenia se agrupan con los cerdos indios

Teniendo en cuenta que los cerdos domésticos de India y Buthan poseen haplotipos mitocondriales que sólo comparten con los jabalíes de dichas regiones (Larson et al. 2011), nuestro resultado evidencia una introgresión directa desde la India hacia África Oriental.

A nivel mitocondrial, algunos cerdos Ugandeses también agrupan con cerdos Europeos (Figura 1). La existencia de una influencia ibérica en África oriental resultaría esperable dado que los portugueses fueron los primeros europeos en circunnavegar África y establecer una serie de puestos comerciales (Kilwa, Sofala, Mombasa, etc.) en su costa oriental (Okello 2002). Por otra parte, la segregación de haplotipos característicos de Extremo Oriente en los cerdos de Uganda, Kenya y Zimbabwe (Figura 1) tiene sentido histórico si se considera que desde el siglo XIV hasta el XVIII las rutas comerciales portuguesas conectaban China (Macao), Malasia (Malaca) y la India (Goa y Calicut) con Kenia (Malindi y Mombasa), Mozambique y otras regiones costeras de África Oriental (Guiñote, 1999). Incluso resulta posible que la introducción de material genético procedente de Extremo Oriente fuera más remota, puesto que múltiples rutas comerciales y exploratorias han recorrido el Océano Índico desde tiempos inmemoriales (Kearney, 2004).

Los resultados obtenidos mediante el chip 60K son muy consistentes con todo lo dicho anteriormente. Los análisis de escalamiento multidimensional y Admixture sugieren que el fondo genético de los cerdos ugandeses posee orígenes occidentales y asiáticos, siendo el componente occidental predominante. Aunque el número de animales analizados a nivel autosómico en este trabajo sea escaso, esta conclusión concuerda con los resultados de Ramírez et al. (2009). Desafortunadamente, no disponemos de datos de genotipado masivo de cerdos indios para investigar qué proporción del genoma de los cerdos Ugandeses posee tal origen.

Por último hemos secuenciado parcialmente el intron 1 del gen *UTY*, en 18 verracos de Uganda. Este gen contiene 2 SNPs diagnósticos que permiten diferenciar entre los dos principales linajes del cromosoma Y, éste es HY1+HY2 vs HY3 (Ramírez et al., 2009). Nuestros resultados indican que en los verracos ugandeses sólo segrega el haplotipo HY1, que está ampliamente distribuido en Asia y Europa. No hemos hallado el haplotipo HY3 que se puede considerar específico de los cerdos Asiáticos y que de acuerdo a Ramírez et al. (2009) segrega a frecuencias elevadas en los cerdos de Kenia (35%) y Zimbabwe (100%). En este sentido, es probable que el impacto de la introgresión de los cerdos de Extremo Oriente en África Oriental haya sido más fuerte en Zimbabwe, donde los cerdos Mukota muestran un fenotipo similar a los cerdos chinos (Ellert, 1993).

En conclusión los cerdos de Uganda y Kenia tienen un origen muy complejo con raíces europeas, indias y del Extremo Oriente. Estos resultados son consistentes con la importancia estratégica de África oriental como punto de intersección del comercio marítimo entre Europa y Asia, una circunstancia que probablemente haya contribuido a incrementar la diversidad genética de las especies domésticas propias de esta área geográfica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandelt H.J., et al. 1999. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Blench R.M. 2000. Routledge Books. pp. 355-367.
- Burgos-Paz W. et al. 2013. *Heredity* 110: 321-30.
- Corpet F. 1988. *Nucl. Acids Res.*, 16 (22): 10881-10890.
- Ellert H. 1993. *Rivers of gold (Zambezián)*. Mambo Press, Gweru, Zimbabwe.
- Goedbloed D.J. et al. 2013. *Mol Écol.* 22: 856-66.
- Guinote P.J.A. 1999. *Vasco da Gama e a Índia*, vol. II, pp 7-39.
- Kearney M. 2004. *The Indian Ocean in World History (Themes in World History)*. Routledge, London, UK.
- Ai H. et al. 2013. *PLoS One* 8: e56001.
- Larson G. et al. 2011. *In: The Genetics of the Pig* pp. 14-37.
- Manunza A. et al. 2013. *PLoS One* 8: e5589.
- Okello B. 2002. *A history of East Africa*. Fountain Publishers, Kampala, Uganda.
- Ramírez O. et al. 2009. *Mol Biol Evol.* 26: 2061-72.

Agradecimientos: Gracias al Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de Uganda y a la Agencia Sueca de Desarrollo Internacional por facilitar la obtención de muestras. Nuestro agradecimiento a Karl Stahl y William Burgos-Paz, por su colaboración en el proyecto.

FOOTPRINT OF MULTIPLE INTROGRESSIONS IN THE MITOCHONDRIAL GENOME OF EAST AFRICAN PIGS

ABSTRACT: Our objective was to analyse the genetic diversity of pigs from Uganda and obtain a more general picture about the ancestry of East African swine. Median-joining network analysis of D-loop sequences from 81 swine from Uganda and others with diverse origins allowed us to identify Western, Indian and Far Eastern genetic signatures in the East African pigs. This result agrees well with the high frequency of zebuine alleles in cattle from East Africa. The genotyping of five Ugandan pigs with the Porcine SNP60 Beadchip agreed well with an Asian/Western mixed ancestry, while sequencing of the Y-chromosome *UTY* locus in 18 Ugandan boars revealed the segregation of a single HY1 lineage that has a cosmopolitan distribution. Our data demonstrate that pigs from East Africa have been targeted by multiple introgression events from other Western and Asian populations.

Keywords: East African swine, D-loop, Median-joining network, massive genotype.

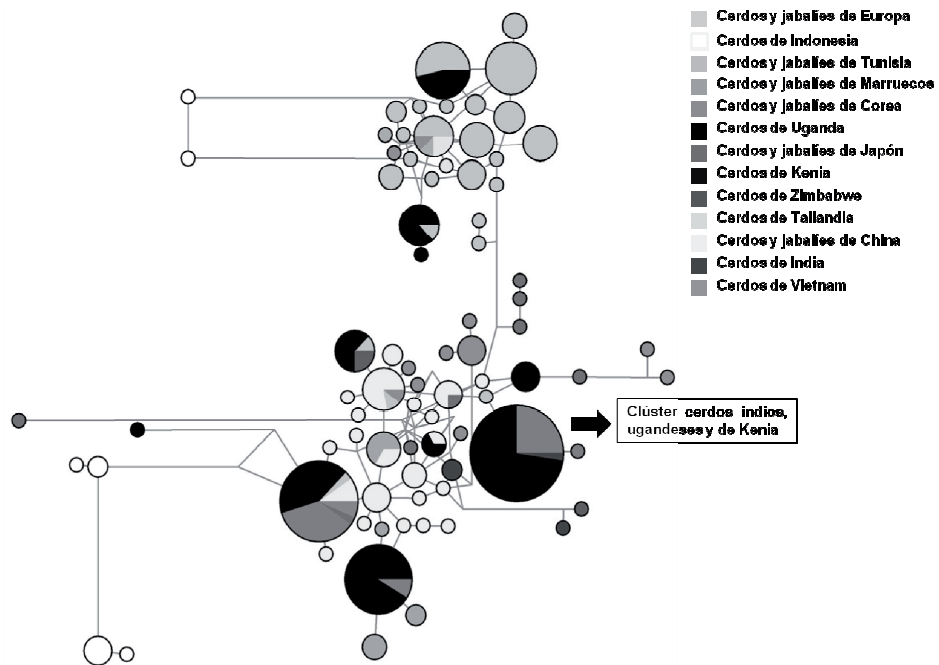


Figura 1. Median-joining network que incluye secuencias mitocondriales de cerdos de Uganda, Europa, Indonesia, Corea, Japón, China, Tailandia, Vietnam, India, Marruecos, Túnez, Kenia y Zimbabue.

EVALUACIÓN DE UN PANEL DE SNP PARA EL CONTROL DE FILIACIÓN EN LA RAZA OVINA RIPOLLESA

Casellas¹, J.

¹Dep. Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona. joaquin.casellas@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los sistemas productivos en extensivo y en semi-extensivo, muy habituales en el caso de las especies de pequeños rumiantes de aptitud cárnica, constituyen una opción muy interesante para el aprovechamiento de las zonas de producción más marginales, no aptas para el cultivo u otros tipos de ganadería. Dentro de este contexto, la raza ovina Ripollesa representa un claro ejemplo, distribuida mayoritariamente entre las provincias de Girona y Barcelona, y considerada como “en peligro de extinción” (Anónimo, 2012). Aunque esta raza dispone de su propia asociación de ganaderos desde el año 1987, y su libro genealógico se fundó en 1990 (Anónimo, 1990), no ha sido hasta recientemente que se ha implementado un programa de control de paternidades mediante el genotipado de marcadores de tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*). Dado que el manejo reproductivo de la mayoría de rebaños se basa en un sistema de montas continuas con múltiples machos, la posibilidad de genotipar los animales y recuperar la información referente a la paternidad resultaba esencial para el correcto funcionamiento del libro genealógico de la raza. Para ello se desarrolló un primer panel de 48 SNP, rápidamente ampliado a 60, que sobre el papel debería funcionar de manera óptima con una probabilidad de exclusión paternal superior al 99,9% (Ferrando et al., 2012). No obstante, la eficacia de cualquier test de paternidad mediante el uso de marcadores genéticos acostumbra a estar a menudo supeditada a la correcta identificación de los progenitores potenciales de cada individuo. Es por ello que la disponibilidad de información adicional como la fecha de nacimiento de cada animal o el rebaño de procedencia puede marcar la diferencia entre el éxito y el fracaso al aplicar estas metodologías moleculares. Por esto, este trabajo se centra en evaluar el panel de SNP diseñado para el control de paternidades de la raza ovina Ripollesa, determinando su capacidad para discriminar el padre de cada individuo por sí mismo o al añadir información adicional sobre la edad o la procedencia geográfica de los animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la actualidad, el programa de mejora de la raza ovina Ripollesa incluye el genotipado de todos los animales de la reposición para los siguientes 60 marcadores SNP: CL635241, CZ920950, CZ920950, DU178311, DU200069, DU202116, DU206327, DU213735, DU216457, DU223894, DU225323, DU231335, DU232778, DU245849, DU247686, DU258149, DU260026, DU298844, DU301854, DU306244, DU308137, DU310703, DU310869, DU322055, DU325267, DU325612, DU326572, DU328870, DU329154, DU351298, DU364675, DU366451, DU370089, DU372397, DU380477, DU380983, DU385524, DU388321, DU407749, DU413994, DU414375, DU440765, DU452167, DU452456, DU458238, DU459083, DU459528, DU463532, DU463771, DU467879, DU470132, DU480434, DU492158, DU492516, DU492723, DU515326, DU524706, DU528988, DU529574 y EE784862. Estos genotipados se realizan mediante el sistema TaqMan® OpenArray® (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) a partir del ADN extraído previamente de una muestra de sangre de cada animal, en la plataforma QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems) del Servicio Veterinario de Genética Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona). Hasta la fecha se han genotipado un total de 4.068 individuos procedentes de 20 rebaños distintos. Para todos estos animales se disponía de información referente a su fecha de nacimiento, sexo, rebaño de origen y, en el caso de los machos reproductores, su fecha de baja. Una vez realizados los genotipados y para cada uno de los animales, se procedió a identificar todos los machos reproductores compatibles desde un punto de vista genético (se aceptó como máximo una incompatibilidad en los SNP), descartándose posteriormente todos aquellos que eran incompatibles debido a que pertenecían a otros rebaños, eran demasiado jóvenes o ya habían sido dados de baja del rebaño cinco meses antes del nacimiento del individuo en cuestión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La probabilidad de exclusión de paternidad resulta fácilmente computable desde un punto de vista teórico a partir de las formulas desarrolladas por Jamieson (1994) y Jamieson y Taylor (1997). No obstante, la eficiencia real de cualquier test de paternidad no depende únicamente de esta probabilidad, sino también de la capacidad de identificar correctamente a los padres potenciales de cada individuo. De no ser así, la lista de candidatos puede verse engrosada artificialmente y dificultar sobremanera la identificación de un único padre compatible. De hecho, sin información adicional como la fecha de nacimiento de cada individuo, se pueden dar situaciones de difícil solución, como invertir las relaciones de padre e hijo o identificar todos los hijos de un individuo como padres potenciales del mismo durante el análisis.

Desde su implantación durante el año 2011, el Programa de Control de Paternidades de la raza ovina Ripollesa ha genotipado un total de 4.068 individuos, identificándose el padre en un 52,4% de los animales nacidos antes de 2011 y en un 91,4% de los animales nacidos entre los años 2011 y 2014. No obstante, estos porcentajes oscilaron de un rebaño a otro, del 0 al 100% para animales nacidos antes del 2011, y de 44,2% al 100% para los años 2011 a 2014. Resulta importante destacar que la bajada en la eficacia para los animales nacidos antes de 2011 se debía a que, en muchos casos, el padre ya había sido dado de baja del rebaño en el momento de empezar a recolectar las muestras de sangre, lo cual imposibilitaba su identificación una vez disponibles los genotipados. Por otro lado, los porcentajes anteriores se obtuvieron no solamente a partir de la información de los genotipados, sino también al determinar los padres potenciales de cada individuo en función de su rebaño de origen y su edad. De no tener en cuenta esta información, el éxito en las determinaciones de las paternidades caía en picado hasta valores inferiores al 10% para todos los animales, ya que en muchos casos aparecían dos o más padres compatibles (para algunos, más de 10 padres posibles).

En conjunto, estos resultados evidenciaron la utilidad de las pruebas de paternidad en pequeños rumiantes, aunque su eficiencia estaba condicionada a una correcta identificación de los progenitores potenciales de cada individuo. De no ser así, su implementación debería desaconsejarse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anónimo. 1990. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya 1376: 5510-5511.
- Anónimo. 2012. Boletín Oficial del Estado 39: 13452-13455.
- Ferrando, A., Casellas, J., Jordana, J. 2012. VIII Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animais, Évora, Portugal.
- Jamieson, A. 1994. Anim. Genet. 25 (supl. 1): 37-44.
- Jamieson, A., Taylor, S.C.S. 1997. Anim. Genet. 28: 397-400.

Agradecimientos: A la *Associació Nacional de Criadors d'Oví de Raça Ripollesa* (ANCRI, Monells, Girona) por la información proporcionada, tanto referente a los genotipados de su Programa de Control de Paternidades como a los registros de cada animal procedentes del Programa de Control de Rendimientos. Este trabajo deriva del proyecto de investigación RZ2011-00015-C03. El contrato de investigación de J. Casellas se enmarca dentro de programa "Ramón y Cajal" (referencia RYC-2009-04049).

Tabla 1. Resultados de identificación de paternidades para los veinte rebaños implicados en el Programa de Control de Paternidades de la raza ovina Ripollesa. Los porcentajes se refieren a animales compatibles con un único semental de la raza, excluyéndose individuos sin ningún padre posible en la base de datos o compatibles con más de un reproductor a la vez.

Rebaño ¹	Animales testados	Porcentaje de detección de paternidad		
		Nacimiento antes de 2011	Nacimiento de 2011 a 2014	Sin considerar rebaño y fecha de nacimiento
AB	178	36,9% (103)	94,7% (75)	14,4%
AN	380	47,2% (180)	96,0% (200)	11,0%
AS	20	50,0% (2)	83,3% (18)	5,4%
BS	426	58,9% (151)	91,3% (275)	12,5%
CA	162	4,2% (24)	96,4% (138)	12,6
CG	650	50,8% (264)	95,3% (386)	9,1%
GD	40	87,5% (8)	100,0% (32)	7,1%
JC	176	68,8% (64)	98,2% (112)	9,8%
JM	182	22,7% (22)	96,3% (160)	10,1%
JX	71	100,0% (3)	70,6% (68)	15,0%
LL	48	20,0% (5)	44,2% (43)	11,1%
MR	688	61,7% (230)	90,6% (458)	8,3%
PA	205	52,1% (94)	87,4% (111)	6,4%
PL	79	0,0% (6)	61,6% (73)	10,5%
QM	19	-	89,5% (19)	8,2%
RB	157	71,1% (90)	100,0% (67)	9,4%
TM	52	65,8% (38)	92,9% (14)	9,8%
UA	34	61,5% (13)	100,0% (21)	9,8%
UN	226	48,7% (119)	98,1% (107)	8,6%
XF	275	34,7% (72)	91,6% (203)	10,7%
Global	4.068	52,4% (1.488)	91,4% (2.580)	9,3%

¹Por razones de confidencialidad, los rebaños se identifican con el código interno de la asociación, sin detallar su nombre u ubicación geográfica.

EVALUATION OF A SNP PANEL FOR PATERNITY TESTING IN THE RIPOLLESA SHEEP BREED

ABSTRACT: Paternity testing initiatives must be viewed as key tools for animal breeding programs under multiple-sire mating systems. This is the case of the Ripollesa sheep breed where genotyping of all replacement individuals with a 60-SNP chip was implemented since 2011. Despite the discriminant power for this custom panel must be greater than 99.9%, its performance could be highly dependant on the correct identification of potential sires for each individual. A total of 4,068 animals have been genotyped and paternity was checked for all of them. When candidate sires were previously identified on the basis of their flock of origin and age, sire was identified for 52.4% of individuals born before 2011 and 91.4% of individuals born between 2011 and 2014; note that most of the rams that sired older individuals were already culled from the flock when blood collection was performed. If analyses restricted to genotyping data, success in sire identification fell up to 9.3%. Within this context, this results highlighted both the usefulness of genotyping programs for paternity identification in small ruminant species and the key role of non-genetic information such as flock of origin and age of rams for optimizing success of paternity tests.

Keywords: genotype, paternity test, ripollesa breed, single nucleotide polymorphism

BUSQUEDA DE ALELOS ALTERNATIVOS ENTRE CERDOS IBERICOS Y DUROC

Barragán, C., Benítez, R., Fernández, A. I., Fernández, A., García, F., Núñez, Y., Ovilo, C., Rodríguez, C. y Silió, L.
 Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid
 E-mail: silio@inia.es

INTRODUCCIÓN

Cerdos Ibéricos colorados procedentes de Portugal y España contribuyeron en el siglo XIX al origen de la raza Duroc–Jersey, posteriormente denominada Duroc. Hacia 1964 se comenzaron a importar animales de esta raza, cuyos híbridos con madres Ibéricas se utilizan mayoritariamente en la producción de cerdos de tipo Ibérico, especialmente en la basada en engorde intensivo. Diversas comparaciones entre cerdos Ibéricos puros y cruzados con Duroc han permitido cuantificar el menor crecimiento y rendimiento en piezas nobles así como la superior calidad de carne de los primeros (Ventanas et al., 2006; Serrano et al., 2008). El estudio del transcriptoma de *m. longissimus* ha permitido identificar decenas de genes diferencialmente expresados entre estos tipos genéticos integrados en redes génicas relacionadas con procesos metabólicos subyacentes a las diferencias fenotípicas observadas (Ovilo et al., 2014). En el presente trabajo se pretende continuar el análisis de las diferencias genéticas entre ambas razas, utilizando información de genotipado masivo de SNPs y de secuenciación masiva, con el objetivo de identificar posibles variantes génicas con alelos exclusivos de cada genoma para el diseño de un panel de marcadores genéticos utilizable en la autenticación del origen racial de animales y productos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales, Genotipos y Secuencias. Mediante el *Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA, USA), se realizó el genotipado de un total de 169 cerdos: 32 de diversas líneas Duroc, 76 Ibéricos de diferentes orígenes genéticos y otros 61 de la línea Torbiscal. Tras pasar el control de calidad estándar, se descartaron aquellos SNPs monomórficos en todos los animales genotipados, los localizados en los cromosomas X e Y y los no mapeados según *Sscrofa* 10.2, siendo 43.451 los SNPs autosómicos utilizados. Muestras de ADN de 17 de estos animales, cinco Duroc y 12 Ibéricos (dos Torbiscal), fueron secuenciadas en grupos de dos por el Centro Nacional de Análisis Genómico (Barcelona).

Análisis de datos. La divergencia entre las frecuencias alélicas de Duroc y cada uno de los grupos Ibéricos se estimó mediante los estadísticos de Wright $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ y el

propuesto por Hedrick (2005) corregido por su máximo alcanzable $F'_{ST} = F_{ST} / F_{ST(max)}$, en

función de la heterocigosidad dentro de grupo $F_{ST(max)} = (1 - H_S) / (1 + H_S)$. De acuerdo con

$$d_i = \sum_{j=i} (F_{ST}^{ij} - E[F_{ST}^{ij}]) / sd[F_{ST}^{ij}]$$

Akey et al. (2010), se calcularon los valores tipificados para

cada SNP, siendo $i =$ Duroc, $j =$ Ibéricos o Torbiscal, $E[F_{ST}^{ij}]$ y $sd E[F_{ST}^{ij}]$ la media y

desviación típica de F_{ST}^{ij} (o en su caso de F'_{ST}^{ij}). Los valores d_i (o d'_i) se promediaron por ventanas solapantes de diez SNPs sucesivos. Las regiones de máxima diferenciación genética se identificaron como aquellas que exceden los percentiles $P_{99.9}$ o $P_{99.5}$ de la distribución a lo largo del genoma de los valores promediados d_i . El contenido génico de estas regiones se identificó utilizando Biomart y las funciones de los mismos mediante la herramienta de notación funcional del Max Planck Institute for Molecular Genetics. El alineamiento de las secuencias obtenidas, y la identificación de variantes nucleotídicas (SNVs) y de los homocigotos se realizó siguiendo el protocolo GATK. Las variantes inicialmente detectadas se verificaron mediante el software SAMTools.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad y diferenciación genética. Los valores de diversidad genética o heterocigosidad esperada en los grupos de animales Duroc, Ibéricos e Ibéricos Torbiscal calculados para el conjunto de SNPs fueron 0,323, 0,250 y 0,196, respectivamente. Los coeficientes de diferenciación entre Duroc e Ibéricos fueron $F_{ST} = 0,137$ y $F_{ST} = 0,247$, para un máximo posible $F_{ST(max)} = 0,554$, dado el valor de $H_S = 0,287$. En la comparación entre Duroc y Torbiscal los valores correspondientes fueron $F_{ST} = 0,188$, $F_{ST} = 0,320$, $F_{ST(max)} = 0,588$ y $H_S = 0,260$. El empleo de F_{ST} permite la comparación de medidas de diversidad basadas en diferente número de loci o en marcadores de diversos niveles de variación. Su utilización en este caso parece justificada dado que entre los SNPs incluidos en el *Porcine SNP60 BeadChip* figuran un buen número de monomórficos en Ibérico, raza que a diferencia de la Duroc no fue considerada en su diseño. El uso de uno u otro estadístico, más allá de las diferencias de escala, da lugar a algunas diferencias en la distribución de los promedios por ventana de d_i o d'_i calculados a lo largo de los 18 autosomas (Figuras 1 a y b). Ello se refleja en las ventanas y regiones de máxima diferenciación genética identificadas en cada caso. Considerando el percentil $P_{99,9}$, el procedimiento basado en el estadístico F_{ST} permite identificar las regiones cromosómicas con frecuencias alélicas más divergentes en los cromosomas 4, 5, 14 y 15 (con dos regiones de ventanas sucesivas), mientras que mediante el basado en F_{ST} las regiones de mayor divergencia se localizan en los cromosomas 4, 5, 9, 14 (3 regiones) y 15 (2 regiones). Teniendo en cuenta los antecedentes conocidos de la raza Duroc, estas regiones no sólo pueden interpretarse como huellas en el genoma de la selección efectuada en esta raza sino como resultantes de las contribuciones de las poblaciones americanas ancestrales que intervinieron en su formación. No puede descartarse asimismo que representen la introgresión de alelos de origen asiático experimentada por esta raza como por la práctica totalidad de las occidentales.

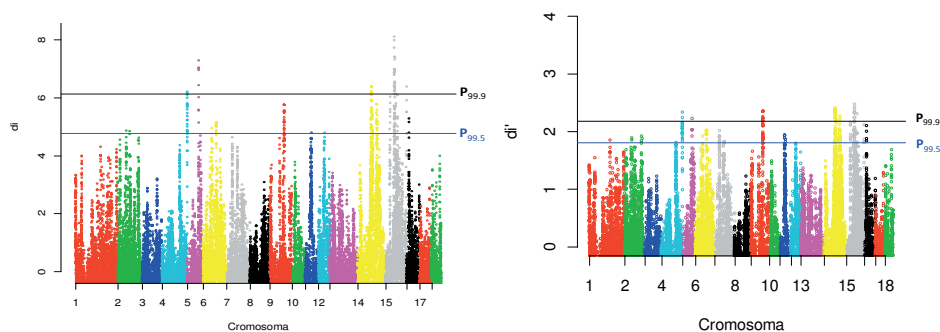


Figura 1 a). Distribución de valores d_i (Duroc vs. Ibericos + Torbiscal) promediados por ventanas deslizantes de 10 SNPs a lo largo de los autosomas **b)** Distribución equivalente de valores d'_i basados en el estadístico F_{ST}

Búsqueda de posibles variantes génicas privativas. Definimos como variantes génicas (SNVs) privativas aquellos SNPs, inserciones o deleciones que presentan variantes alternativas en cada una de las razas analizadas. Nuestro interés en los SNVs poseedores de esta característica se debe a que aportan la máxima información por locus a la discriminación entre orígenes genéticos. Su búsqueda, a partir de las 17 secuencias disponibles, se ha centrado en las 31 regiones formadas por las 215 ventanas con frecuencias divergentes que exceden el percentil $P_{99,5}$, con una longitud total de 28.378.218 pb distribuidas en once cromosomas. Estas regiones contienen en total 190 genes, de ellos sólo 123 conocidos, algunos duplicados (*7SK*, *CALCB*, *SNORA19*) o con hasta siete copias (*U6*). El análisis funcional preliminar de los 114 genes restantes ha mostrado el enriquecimiento de algunas funciones básicas, entre otras relacionadas con la cadena de proteínas MAPK (mitogen-activated protein kinases) que comunican señales en receptores de la membrana celular inductoras de transcripción del ADN nuclear.

Mediante la comparación de secuencias de individuos de ambas razas, se han detectado 255 SNVs, de ellos 91 con localización intragénica, para los que los animales secuenciados

son homocigotos con variantes alternativas en cada raza (Tabla 1). Estos resultados están fuertemente condicionados por la cobertura mínima exigida a las secuencias. Debe subrayarse asimismo que el limitado número de secuencias hace necesaria una posterior validación mediante el genotipado de aquellos más idóneos en un número mayor de animales. Entre los genes con SNVs privativos en sus secuencias destacan por el elevado número de éstos los genes *KHDRBS2* (SSC7) con 14 SNVs privativos, *WRN* y *TNKS* (SSC15) con 40 y 20 SNVs privativos respectivamente. El interés de estos genes se extiende a sus características funcionales relacionadas con las diferencias fenotípicas entre las razas comparadas. El gen *KHDRBS2* se ha relacionado en ratón con el desarrollo de la masa muscular (Karst et al., 2011). Los genes *WRN* y *TNKS* se relacionan con la regulación de la telomerasa, una de las funciones que presentan enriquecimiento en las regiones divergentes. Para Steibel et al. (2011), que han identificado en *WRN* un eQTL coincidente con un pQTL con efectos sobre área de lomo y terneza de la carne de cerdo, las funciones de esta proteína relacionadas con el crecimiento celular y la transcripción sugieren su posible efecto sobre el desarrollo muscular y la calidad de carne.

Tabla 1. Regiones del genoma con frecuencias alélicas divergentes en las que se han detectado potenciales SNVs privativos, distribución de los 255 identificados y de los 91 con localización intragénica.

Cromosoma	Región (pb)	Nº de Genes	Nº SNVs privativos	Genes con SNVs privativos	SNVs privativos intragénicos
2	138.702	3	2	1	2
4	1.286.528	8	26	4	1;3;1;1
7	738.747	4	17	1	14
7	339.534	3	1	1	1
15	1.538.921	11	113	2	40; 1
15	1.302.509	6	90	3	2; 1; 20
15	1.810.768	7	4	1	4
15	563.092	3	2	0	0
Total		45	255	13	91

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akey J.M. 2010. PNAS 107 (3): 1160-1165.
- Hedrick P.W. 2005. Evolution 59: 1633-1638.
- Karst S. et al. 2011. Mamm. Genome. 22: 530-543.
- Óvilo C. et al. 2014 BMC Genomics 15: 413.
- Serrano M.P. et al. 2008. Meat. Sci. 78: 420-428.
- Steibel J.P. et al. 2011. PLoS ONE. 6 (2) e16766.
- Ventanas et al. 2006. Meat Sci 73: 651-659.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el Proyecto INIA RZ2012-00006-00-00.

SEARCHING PRIVATIVE BREED ALLELES BETWEEN DUROC AND IBERIAN PIGS

ABSTRACT: The final goal of this study is the design of a panel of genetic markers with breed specific alleles suitable to authenticate purebred Iberian and Duroc x Iberian crossbred pigs and their products with flexible and cheap lab methods. We report the results of a first research based on genome data from 169 representative pigs (32 Duroc and 137 Iberian) typed for over 43,000 autosomal SNPs, and DNA sequences of five Duroc and 12 Iberian. Using F_{ST} and F'_{ST} outlier tests we identified 31 genome regions with divergent allelic frequencies which include 114 known genes. The analysis of these regions in the available sequences allowed the identification of a 255 SNVs with potential breed specific alleles, 91 out of those with intragenic location. The functions of some of the differentiated genes indicate their possible role related to some of the main phenotypic differences between both breeds.

Keywords: Iberian pig, Duroc, breed specific alleles, authentication

Calidad de los productos

INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN, TAMAÑO DE EXPLOTACIÓN Y ASOCIACIONISMO EN EL RECUESTO DE MICROORGANISMOS EN LECHE DE TANQUE DE OVEJA

Jiménez*, L., Oliete, B., M.D. Pérez-Guzmán, Arias, R.
Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA), España
Avenida del Vino, 10. 13.300 Valdepeñas (Ciudad Real). *lorenaj@jccm.es

INTRODUCCIÓN

El control de la calidad de la leche en la producción primaria es uno de los problemas técnicos más importantes del sector ovino lechero. Para ello se han implantado sistemas de control de la calidad higiénica de la leche (recuento de bacterias mesófilas totales), siguiendo la normativa establecida por la Unión Europea en materia de higiene de los productos alimenticios (Reglamento CE 853/2004). La presencia de microorganismos en la leche puede deberse a infecciones intramamarias y/o a la contaminación ambiental (suciedad de la ubre, sala de ordeño, lechería, etc). Gonzalo et al., 2006 señalaron que el recuento de mesófilas totales (RMT) nos permite evaluar el nivel de adecuación de las prácticas de limpieza de las ganaderías, además de asegurar la correcta calidad de la leche y los productos lácteos que de ella se derivan. Sin embargo, se dispone de escasa información sobre los grupos de microorganismos presentes en la leche y su relación con determinados factores que influyen en la producción ganadera. Dada la gran importancia de la leche de oveja Manchega en Castilla-La Mancha, se plantea este trabajo cuyo objetivo es estudiar la influencia de la estación, el tamaño de explotación y la pertenencia a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Manchega (AGRAMA) sobre el recuento de diferentes grupos de microorganismos en la leche de oveja de raza Manchega.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado en 80 ganaderías de ovino lechero de Castilla-La Mancha. Se han tomado 4 muestras de leche de tanque de cada ganadería durante los años 2012-2013, una en cada estación del año. Asimismo, se ha realizado a cada una de las 80 ganaderías una encuesta sobre su estructura productiva, social, económica y ambiental. En este estudio se han tenido en cuenta los siguientes factores: número de ovejas reproductoras por explotación y pertenencia a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Manchega (AGRAMA). Por otro lado, esta Asociación viene realizando el Programa para la Mejora de la Calidad de la Leche Cruda, amparado por el Real Decreto 1589/2009, que establece las bases reguladoras para la concesión de subvenciones por implantación de sistemas de aseguramiento para la mejora integral de la calidad de la leche cruda producida y recogida en las explotaciones, y su certificación externa. Las muestras de leche se han recogido, previa homogenización del contenido del tanque de refrigeración, en contenedores estériles de 50 ml., siendo transportadas en condiciones de refrigeración hasta el Laboratorio de Lactología del CERSYRA de Valdepeñas (Ciudad Real), para proceder a su análisis microbiológico diferencial. A partir de cada muestra de leche se realizaron diluciones seriadas para inocular 0.1 ml en diferentes medios de cultivo. Así, para el recuento total de bacterias mesófilas (RMT), termodúricas (TERMO) y psicotrofos (PSICRO) se utilizó el medio Plate Count Agar (PCA) (Panreac, Barcelona, Spain). Los microorganismos mesófilos y termodúricos (obtenidos tras pasteurización de la leche 62,8 °C durante 30 minutos), se incubaron en condiciones de aerobiosis a 30°C durante 72 horas (ISO 4833:2003). Los psicotrofos fueron incubados a 6,5°C durante 10 días (ISO 6730:2005). La determinación de coliformes (COLIT) se realizó con el medio Cromold™ Coli (bioMérieux, Madrid, España), incubado a 37°C durante 24 horas. Para el recuento de estafilococos coagulasa positivos (SCP) se utilizó el medio Agar Baird Parker RPF (bioMérieux, Madrid, España), incubando a 37°C durante 24 horas. Las bacterias lácticas (LACT) se han sembrado en medio MRS (Panreac, Barcelona, España) acidificado a pH=5,7, incubándose a 30°C durante 72 horas (ISO 15214:1998). Los datos obtenidos de los recuentos microbiológicos se han transformado en logaritmos decimales. Se ha realizado un análisis GLM con el programa estadístico SAS (1990), elaborando el siguiente modelo: $Y_{ijkl} = \mu + EST_i + TE_j + AG_k + e_{ijkl}$. Donde: Y_{ijkl} = variable estudiada (logMESO, logTERMO, logPSICRO, logCOLIT, logSCP, logLAC); μ = media general; $EST_{i(k)}$ = efecto fijo de la estación del año: invierno, primavera,

verano, otoño; TE_j= efecto fijo del censo ovejas reproductoras de la ganadería: (pequeña<600 ovejas; mediana=600-1200 ovejas; grande≥1.200 ovejas); AG_k = efecto fijo de la pertenencia a AGRAMA (sí, no); e_{ijkl} = error residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el modelo estadístico se ha estimado la influencia de los factores estación del año, tamaño de explotación y pertenencia a AGRAMA, cuyos resultados se recogen en la Tabla 1. Los recuentos medios de los principales grupos microbianos de la leche de tanque de ganaderías de ovino lechero se exponen en la Tabla 2. Estos recuentos se encuentran en la línea de los resultados de otros estudios en leche de oveja, como el de Garnica et al. (2013). En el estudio se constata un efecto significativo de la estación del año sobre el recuento de PSICRO, con recuentos más altos en invierno, en la línea de otros estudios en ovino lechero (De Garnica et al., 2013). Un aumento de gérmenes psicrotrofos informa de unas deficiencias higiénicas y de un tiempo de conservación alto de la leche, ya que estos gérmenes se multiplican de forma óptima a temperaturas de refrigeración. Sin embargo, cuando se analiza la relación entre la estación y los grupos diferenciales de microorganismos, los recuentos más elevados se obtienen en verano, siendo este efecto significativo para los COLIT, SCP y LACT. Todaro et al. (2015) destacan el deterioro en la calidad de la leche, con un incremento en el recuento de estafilococos y coliformes totales relacionado altas temperaturas ambientales. Altos recuentos de coliformes se relacionan con contaminación ambiental-fecal, mientras que altos recuentos de estafilococos coagulasa positivos se relacionan con la aparición de mamitis, sobre todo a causa de *Staphylococcus aureus*. Respecto al tamaño de explotación se observa un efecto significativo respecto al recuento de LACT, con niveles superiores en explotaciones con un mayor número de ovejas. También, se observa unos mayores recuentos de RMT, TERMO y PSICRO en las ganaderías con menores censos; en esta línea, Alexopoulos, et al. (2011) destaca el efecto significativo del tamaño de explotación sobre el recuento de gérmenes, sobre todo en el caso de mesófilos totales, para los que señala recuentos elevados en explotaciones pequeñas de 100 a 200 animales. Hay que destacar también la tendencia al aumento de los recuentos de SCP conforme se incrementa el tamaño de la explotación, indicando un probable deterioro de la sanidad mamaria en explotaciones con un mayor número de ovejas. Por último, el efecto de pertenencia a AGRAMA muestra un resultado significativo en los recuentos de RMT, TERMO, PSICRO, SCP y LACT. En general, respecto al recuento de mesófilos, termodúricos y psicrófilos, la leche de las ganaderías de AGRAMA muestra una mayor calidad microbiológica, evidenciando mejores condiciones higiénicas y de conservación de la leche. Además, existe un recuento significativamente menor de estafilococos coagulasa positivos, y menores niveles de coliformes. Estos resultados indican la importancia de una buena gestión ganadera sobre la calidad microbiológica de la leche. En este caso AGRAMA como asociación ha influido positivamente en la mejora de la calidad de la leche al implantar desde hace una década un Programa de Mejora de Calidad de la Leche Cruda. Conclusiones similares sobre la conveniencia del asociacionismo obtienen Rivas et al. (2014), en un estudio sobre el nivel de competitividad del sistema productivo ovino lechero. A la vista de los resultados obtenidos se concluye que el recuento de gérmenes totales que se realiza actualmente en las ganaderías, es un indicador poco específico de la calidad de la leche en ganaderías de ovino lechero, y que la información microbiológica diferencial puede ser muy útil para la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias de la ganadería. AGRAMA como asociación esta siendo un medio efectivo en la implantación de un Programa de Mejora de la Calidad de la Leche Cruda, que repercute en una mejora de la calidad de la leche y, en definitiva, en la sostenibilidad de sus explotaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexopoulos, A., et al. 2011. Anaerobe 17,276-279 • Gonzalo, C., et al. 2006. J. Dairy Sci., 89, 549-552. • de Garnica, M.L., et al. 2013. J. Dairy Sci. 96,1-9. • ISO 4833:2003. • ISO 6730:2005. • ISO 15214:1998. • Reglamento CE N° 853/2004 (DOL139 de 30.4.2004, p. 55/205). • Rivas, J., et al. 2014c. Book of abstracts of the 65th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP). Copenhagen, Dinamarca. 25-29/08/2014. •

Sawant, A., et al. 2004. J. Dairy Sci, 85,1127–1132 •Todaro, M. et al. 2015. Small Rum. Res. PII: S0921-4488(15)00051-6.

Agradecimientos: Estudio financiado por el Proyecto INIA RTA 2011-00057-C02-01. Los autores expresan su agradecimiento a AGRAMA y a JCCM.

Tabla 1. Test de Significación y porcentajes de varianza explicada de los efectos estudiados para los recuentos microbianos de leche de oveja.

		MESO	TERMO	PSICRO	COLIT	SCP	LACT
	R ²	0.09	0.03	0.14	0.08	0.05	0.12
ESTACIÓN	gl	3	3	3	3	3	3
	p	NS	NS	**	***	*	***
	VE (%)	1.80	1.38	3.45	7.46	2.46	8.87
TAMAÑO EXPLOTACIÓN	gl	2	2	2	2	2	2
	p	NS	NS	NS	NS	NS	*
	VE (%)	0.87	0.74	0.88	0.08	0.92	1.57
AGRAMA	gl	1	1	1	1	1	1
	p	***	*	***	NS	**	**
	VE (%)	5.26	1.42	7.73	0.83	2.89	2.41

***: p<0,001; **: p<0,01; *: p<0,05 NS: p>0,05

VE: Varianza explicada

Tabla 2. Recuentos microbianos (LSM ± SE) de acuerdo a la estación, el tamaño de explotación y la pertenencia o no a AGRAMA.

ESTACIÓN	RECUEENTOS MICROBIANOS						
	MESO	TERMO	PSICRO	COLIT	SCP	LACT	
Invierno	5,72±0,07 ^a	3,05±0,09 ^a	5,37±0,11 ^a	2,74±0,09 ^c	2,47±0,14 ^a	4,64±0,07 ^b	
Primavera	5,43±0,07 ^b	3,08±0,09 ^a	4,79±0,12 ^b	3,18±0,10 ^b	2,48±0,14 ^a	4,78±0,07 ^b	
Verano	5,56±0,07 ^a	2,99±0,09 ^b	4,98±0,11 ^b	3,45±0,09 ^a	2,55±0,14 ^a	5,21±0,07 ^a	
Otoño	5,61±0,07 ^a	3,28±0,09 ^a	4,99±0,12 ^b	2,98±0,09 ^b	2,02±0,13 ^b	4,78±0,06 ^b	
TAMAÑO EXPLOTACIÓN	< 600 ovejas	5,67±0,06 ^a	3,18±0,08 ^a	5,18±0,10 ^a	3,13±0,08 ^a	2,23±0,12 ^a	4,77±0,06 ^b
	600-1200 ovejas	5,50±0,06 ^a	2,99±0,08 ^a	4,92±0,10 ^b	3,07±0,08 ^a	2,34±0,12 ^a	4,80±0,06 ^b
	>1200 ovejas	5,56±0,06 ^a	3,13±0,08 ^a	5,00±0,11 ^b	3,07±0,08 ^a	2,56±0,12 ^a	4,98±0,06 ^a
AGRAMA	Si	5,40±0,05 ^b	2,98±0,07 ^b	4,70±0,09 ^b	2,99±0,07 ^a	2,13±0,10 ^b	4,73±0,05 ^b
	No	5,76±0,05 ^a	3,22±0,06 ^a	5,37±0,08 ^a	3,18±0,06 ^a	2,62±0,09 ^a	4,97±0,04 ^a

Superíndices distintos ^{a, b, c}: p<0,05

INFLUENCE OF SEASON, FARM SIZE AND BELONGING TO AN ASSOCIATION IN THE MICROORGANISMS COUNT OF SHEEP MILK

ABSTRACT: Nowadays there are controls of payment systems for hygienic-sanitary quality (total bacterial count (TBC) and somatic cell count (SCC) milk sheep. However, there is little information about microorganisms groups appearing in milk and their connection with some factors that are involved in livestock production. Because of the value of Manchega sheep milk in Castilla-La Mancha, the aim of the study is to examine the influence of the season, the farm size and being member of National Breed Association of Manchega Sheep (AGRAMA) over the count of different microorganisms in sheep's milk Manchega breed. In view of the results, it is showed that total bacteria count that are currently performed in flocks, gives an idea of what is the general hygienic-sanitary level of the farm. However, the differential microbial count is an important indicator for a more accurate assessment of the specific needs of different holdings, linked to different indicators of interest, that affect the increase in final profitability of livestock farming.

Keywords: sheep, microorganisms, milk

EFFECTO DE LOS GRADOS DÍA DE AYUNO Y DEL HACINAMIENTO PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE EL CONTENIDO ESTOMACAL Y RESPUESTA DE ESTRÉS EN TRUCHA ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Bermejo-Poza^{1*}, R., De la Fuente¹, J., Pérez², C., Lauzurica¹, S., González de Chavarri¹, E., Díaz³, M.T., Torrent⁴, F. y Villarroel⁵, M.

¹UCM, Fac. Vet. Dpto. Prod. Animal, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid.. ²UCM, Fac. Vet. Dpto. Fisiología (Fisiología Animal), Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040. Madrid. ³INIA, Dpto. Tec. Alimentos, Ctra. De la Coruña, km 7.5, 28040. Madrid. ⁴UPM, ETSI de Montes Dpto. Ingeniería Forestal, Ciudad Universitaria s/n, 28040. Madrid. ⁵UPM, ETSIA Dpto. Prod. Animal, Avenida Puerta de Hierro 2, 28040. Madrid. *rbermejop89@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El ayuno pre-sacrificio es una práctica rutinaria en acuicultura que se lleva a cabo para vaciar el aparato digestivo disminuyendo la cantidad de heces y previniendo una contaminación de la canal (Robb, 2008). Sin embargo, el ayuno puede también incrementar los niveles de estrés de los peces y si estos son lo suficientemente altos afectan a la calidad de la canal (Poli *et al.*, 2005). Recientemente, algunos autores han analizado el efecto de un ayuno de corta duración (hasta tres días) sobre los indicadores plasmáticos de estrés en la trucha arcoíris (Hoseini *et al.*, 2013), incluyendo el efecto de la temperatura del agua mediante los grados día (López-Luna *et al.*, 2013) y su efecto sobre la calidad de la canal (López-Luna *et al.*, 2014), encontrando todos que la trucha es capaz de adaptarse a un ayuno de ese tipo con valores similares de cortisol, lactato y glucosa en peces ayunados y no ayunados. Por otro lado, hay estudios que han demostrado que hay prácticas de manejo previas al sacrificio como la captura y el hacinamiento que provocan distintos grados de respuesta de estrés en los peces, incrementando los niveles de cortisol (Poli *et al.*, 2005). En este trabajo se ha tratado de valorar el impacto del ayuno (158,2 °C día) y del hacinamiento pre-sacrificio en trucha arcoíris, así como el efecto conjunto de los dos, en el peso y distintos indicadores sanguíneos de bienestar como el cortisol, lactato, glucosa, triglicéridos y creatin fosfoquinasa (CPK).

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 4 tanques paralelos de 5,16 m³ de capacidad que disponían de agua proveniente de pozo, proporcionando un flujo de agua constante. Se usaron 144 truchas arcoíris procedentes de la granja Cien Fuentes (Cifuentes, Guadalajara). Cuando las truchas llegaron a las instalaciones, se dividieron de forma aleatoria entre los cuatro tanques (n=36). Los animales fueron alimentados dos veces al día con un pienso comercial (42% PB, 23% grasa, 4,1% cenizas y 2% FB, 30 ppm astaxantina; 1% tasa de alimentación). Para calcular los grados día (°C d), se midió la temperatura del agua cada 5 minutos utilizando sensores de temperatura sumergibles en agua (Hobo@-U11). Los cuatro grupos formados tuvieron distintos tiempos de ayuno y hacinamiento previos al sacrificio. Dos grupos fueron sometidos a 7 días de ayuno antes del sacrificio (158,2 °C d) y los otros dos no fueron ayunados. Un grupo de cada tipo de tiempo de ayuno fue ejercitado 20 minutos antes del sacrificio persiguiendo a los peces con salabardos y utilizando una red de separación para agrupar a los peces en un espacio más pequeño. Como resultado, los peces quedaron divididos en cuatro grupos: NANH (ni ayuno ni hacinamiento), NAH (no ayuno, sí hacinamiento), ANH (sí ayuno, no hacinamiento) y AH (ayuno y hacinamiento). Se sacrificaron los peces, previo aturdimiento eléctrico, mediante decapitación. Inmediatamente tras el sacrificio, se tomaron las muestras sanguíneas de la vena caudal de 18 truchas de cada grupo dividiéndolas en dos eppendorf, uno con fluoruro de sodio (glucosa, lactato) y otro con EDTA (cortisol, triglicéridos y CPK). Ambos tubos se centrifugaron a 6.000 rpm durante 10 min para separar el plasma y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Para la determinación de la glucosa y el ión lactato se utilizaron métodos enzimáticos-espectrofotométricos (Spinreact, S.A., Sant Esteve de Bas, España), el cortisol mediante enzimoimmunoanálisis con un kit comercial Cortisol (Radim Ibérica S.A., Barcelona, España), los triglicéridos con un método enzimático mediante un kit comercial (Boehringer Mannheim, Barcelona, España) y la CPK con un analizador químico Roche/Hitachi 717

(Roche Diagnostics, S.L., Sant Cugat del Valles, España). Tras la extracción de las muestras sanguíneas, los peces se midieron, pesaron y visceraron. Se calculó el coeficiente de condición o CC ($CC = \text{Peso sacrificio (g)} / \text{Longitud corporal}^3 \text{ (cm)}$). Se pesó el contenido estomacal para calcular el peso vivo vacío. El contenido estomacal se expresó como % relativo al peso del estómago. Se midieron también los pesos del aparato digestivo (de estómago a ano, incluyendo la grasa visceral) e hígado, expresándose como % relativo al peso vivo vacío (DSI: índice somático del digestivo, HSI: índice somático del hígado). El rendimiento a la canal se calculó como el cociente entre el peso al sacrificio y el peso canal, expresándose como porcentaje también. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el procedimiento GLM del programa SAS 9.1. Para la comparación de medias se utilizó el test de Bonferroni con un 5% como nivel de significación ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El coeficiente de condición estuvo afectado por el tiempo de ayuno ($p=0,002$), siendo mayor en las truchas no ayunadas ($1,11 \pm 0,01$) que en las sometidas a ayuno ($1,06 \pm 0,01$). Pottinger *et al.* (2003) observaron que a los 7 días de ayuno disminuye el CC en la trucha arcoíris. El contenido estomacal, DSI, HSI y rendimiento canal presentaron diferencias significativas respecto al tiempo de ayuno pero no por el hacinamiento (*Tabla 1*). El contenido estomacal y DSI fueron mayores en los peces no ayunados debido a la mayor cantidad de alimento en el tracto digestivo en el momento del sacrificio, lo que a su vez dio lugar a un menor rendimiento canal en las truchas no ayunadas. Estos resultados coinciden Lines y Spence (2012), quienes observaron que la duración del ayuno necesaria para vaciar el estómago varía de 1 a 5 días, dependiendo de la temperatura del agua. Las truchas no ayunadas presentaron un mayor HSI que las sometidas a ayuno, posiblemente debido a una reducción de los niveles de glucógeno hepático y triglicéridos (Davis y Gaylord, 2011). Los resultados de los parámetros hematológicos se presentan en la *Tabla 2*. El cortisol fue mayor en las truchas no ayunadas, como observaron con anterioridad en trucha arcoíris Sumpter *et al.* (1991), y en las sometidas al hacinamiento, debido a una mayor respuesta de estrés (Poli *et al.*, 2005). El lactato siguió el mismo esquema que el cortisol, siendo mayor en las truchas no ayunadas y en las sometidas al hacinamiento. Debido a un mayor movimiento previo al sacrificio en las truchas con hacinamiento, se incrementó el metabolismo anaeróbico de las fibras musculares aumentando los niveles de lactato plasmático (Merkin *et al.*, 2010). La disminución debida al ayuno pudo ser por un incremento de la utilización del lactato como sustrato en la gluconeogénesis hepática (Polakof *et al.*, 2006). La concentración plasmática de glucosa fue mayor en las truchas sometidas al hacinamiento que en las que no fueron hacinadas, debido a un incremento de la gluconeogénesis para mantener la homeostasis (López-Patiño *et al.*, 2014). Los triglicéridos presentaron un valor más alto en las truchas sometidas a ayuno que en las no ayunadas, indicando que las reservas grasas disminuyeron (Costas *et al.*, 2011). Hubo una interacción significativa entre los dos factores en la CPK, con el valor más pequeño en el grupo ANH. Esto pudo ser atribuido a que los peces ayunados sufren una disminución de la síntesis enzimática debido a su menor demanda metabólica (Echevarria *et al.*, 1997). Concluyendo, independientemente del tiempo de ayuno, parece esencial disminuir todo lo posible el tiempo de hacinamiento pre-sacrificio para preservar el bienestar de la trucha arcoíris.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costas, B. *et al.* 2011. *Fish Physiol. Biochem.* 37: 495-504.
- Davis, K.B. y Gaylord, T.G. 2011. *Comp. Biochem. Physiol. A* 158: 30-36.
- Echevarria, G. *et al.* 1997. *Comp. Biochem. Physiol. A* 118: 111-123.
- Hoseini, S.M. *et al.* 2013. *J. Appl. Ichthyol.* 30: 569-573.
- Lines, J.A. y Spence, J. 2012. *Fish Physiol. Biochem.* 38: 153-162.
- López-Luna, J. *et al.* 2013. *Aquaculture* 400: 142-147.
- López-Luna, J. *et al.* 2014. *Aquaculture* 420-421: 63-70.
- López-Patiño, M.A. *et al.* 2014. *Comp. Biochem. Physiol. A* 168: 40-49.
- Merkin, G.V. *et al.* 2010. *Aquaculture* 309: 231-235.
- Polakof, S. *et al.* 2006. *J. Comp. Physiol. B* 176: 441-452.
- Poli, B.M. *et al.* 2005. *Aquacult. Int.* 13: 29-49.
- Pottinger, T.G. *et al.* 2003. *Comp. Biochem. Physiol. B* 136: 403-417.
- Robb, D.H.F. 2008. *Fish Welfare*: pp. 217-242.
- Sumpter, J.P. *et al.* 1991. *Gen. Comp. Endocr.* 83: 94-102.

Agradecimientos: Esta prueba ha sido financiada por el proyecto AGL2010-19479.

Tabla 1. Medias de contenido estomacal (CE), índices somáticos del digestivo (DSI) e hígado (HSI) y rendimiento canal (RE) expresados en porcentaje y en función del tiempo de ayuno (A) y del hacinamiento (H).

	NA		A		EEM ¹	Significación (p)		
	NH	H	NH	H		A	H	A x H
CE	44,13 ^a	48,15 ^a	9,87 ^b	5,11 ^b	1,81	<0,001	0,92	0,23
DSI	9,81 ^a	10,48 ^a	7,35 ^b	6,94 ^b	0,16	<0,001	0,70	0,11
HSI	1,56	1,52	1,42	1,50	0,02	0,04	0,58	0,11
RC	88,33 ^b	87,63 ^b	90,92 ^a	91,20 ^a	0,17	<0,001	0,55	0,17

¹ Error estándar de la media

^{a, b} Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 2. Medias de niveles plasmáticos de cortisol (Cort, ng/ml), lactato (Lact, mmol/l), glucosa (Gluc, mg/dl), triglicéridos (TGC, mg/dl) y creatin fosfoquinasa (CPK, U/l) en función del tiempo de ayuno (A) y del hacinamiento (H).

	NA		A		EEM ¹	Significación (p)		
	NH	H	NH	H		A	H	A x H
Cort	15,56 ^b	25,37 ^a	10,12 ^c	23,38 ^a	0,50	0,004	<0,001	0,09
Lact	5,87 ^b	7,79 ^a	4,30 ^c	6,31 ^b	0,17	<0,001	<0,001	0,89
Gluc	78,39 ^b	112,83 ^a	71,89 ^b	115,11 ^a	1,96	0,59	<0,001	0,27
TGC	314 ^a	409 ^a	173 ^b	181 ^b	14,17	<0,001	0,07	0,13
CPK	825	702	496	707	79,07	0,09	0,33	0,09

¹ Error estándar de la media

^{a, b, c} Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

EFFECT OF DEGREE DAYS OF FASTING AND CROWDING BEFORE SLAUGHTER ON STOMACH CONTENT AND STRESS RESPONSE IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

ABSTRACT: In aquaculture, pre-slaughter handling includes fasting to ensure emptying of the digestive system and crowding and capturing fish from tanks or cages before slaughter. To analyse the effect of both of these potential stressors, 144 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) were fasted for 7 days (158.2 °C days) and crowded in their raceways for 20 min, and later compared to controls (neither fasted nor crowded). The stomach content, coefficient of condition, liver somatic index, plasma cortisol, lactate and triglycerides were lower in fasted trout. Conversely, crowding stress increased plasma cortisol, lactate and glucose, suggesting a decrease in their welfare level. Fasting up to 150 °C days did not seem to have a negative effect on stress but crowding was stressful and its effect on stress but crowding was stressful and its effects were independent of fasting status.

Keywords: fasting, crowding, animal welfare, degree-days

FACTORES DE RIESGO QUE INFLUYEN EN LA INCIDENCIA DE HEMATOMAS Y ALTO pH MUSCULAR EN CANALES VACUNAS DURANTE EL TRANSPORTE Y LAS OPERACIONES PRE-SACRIFICIO EN COLOMBIA

Romero¹, M.P. y Miranda-de la Lama^{2*}, G.C.

¹ Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.

² Departamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, Av. Hidalgo Poniente 46, 52006, Lerma de Villada, Estado de México, México. *g.miranda@correo.ler.uam.mx

INTRODUCCIÓN

El transporte y las operaciones pre-sacrificio ocasiona, en las mejores condiciones, un marcado estrés en los animales. La intensidad de esta experiencia depende principalmente de la calidad de la conducción, la duración del viaje, los niveles de vibración, el ayuno, las condiciones atmosféricas, el diseño de los vehículos, la densidad de carga y la mezcla social (Miranda-de la Lama et al., 2014). En este sentido, la creciente demanda de transporte y de las operaciones pre-sacrificio son componentes necesarios de la cadena de producción de carne colombiana. Los sistemas de producción vacuna en Colombia son mayoritariamente extensivos y basados principalmente en *Bos indicus* y *Bos taurus* X *Bos indicus*, donde *B. indicus* está representado por Cebú Comercial y ganado Brahman, y *B. Taurus* por Angus, Senepol, Simmental y razas criollas (Blanco Orejinegro, Romosinuano y Sanmartinero) (Vergara, et al., 2009). Colombia se ubica como el cuarto mayor productor de carne de América Latina con un hato comercial de 27,7 millones de cabezas. En este contexto, el sector ganadero colombiano se encuentra actualmente en un proceso de modernización selectiva en las condiciones de producción y en la instauración de una cadena logística pre-sacrificio. Aunque los efectos negativos de las operaciones pre-sacrificio han sido relativamente bien estudiadas en algunas regiones del mundo, en América Latina, en particular en Colombia, el tema ha recibido una atención limitada. Por lo tanto, es importante examinar los procedimientos de operación de un matadero típico de exportación con el fin de detectar los efectos perjudiciales que dichas operaciones pueden tener sobre el bienestar animal y la calidad de la carne, para poder recomendar los cambios adecuados en rutinas de manejo que puedan minimizar el coste biológico para animales durante el proceso de pre-sacrificio y mejorar la calidad del producto. El objetivo de este estudio fue investigar los factores de riesgo como posibles causas de los hematomas y pH muscular alto, observados en condiciones de operación comercial en Colombia.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó durante los meses de julio, agosto y septiembre de 2011 en la planta de sacrificio de bovinos más moderna de Colombia, localizada en el departamento de Córdoba. Se evaluaron 1.179 bovinos cebú comercial (*Bos indicus*), manejados bajo condiciones extensivas en pasturas naturales. Los animales fueron transportados bajo condiciones comerciales y alojados en la planta de sacrificio en corrales individuales por lotes de 14 o 15 animales, con una densidad promedio de 2,5 m²/animal, sometidos a ayuno, con disponibilidad de agua potable *ad libitum*. Al arribo se registró el tiempo de transporte (h), densidad de carga (espacio disponible por animal en el remolque del vehículo, Kg/m²), procedencia (finca o feria) y tiempo de estadía en planta (tiempo en horas, desde la llegada a la planta hasta el ingreso al cajón de insensibilización). Los animales fueron conducidos por personal de la planta a través de corredores curvos hasta el cajón de insensibilización. La insensibilización se realizó con una pistola de perno cautivo no penetrante, inmediatamente fueron izados y sangrados. Los animales se clasificaron como novillos (machos castrados entre 1 a 3 años), toretes (machos enteros entre 1 a 3 años), toros (machos usados como reproductores mayores de 3 años), novillas (hembras de carne entre 1 a 3 años) y vacas (hembras de descarte mayores de 3 años). Se consideraron como hematomas las lesiones traumáticas con ruptura de los vasos sanguíneos, con acumulación de sangre y suero; sin discontinuidad cutánea. El protocolo de evaluación post-mortem de las hematomas se basó en el sistema de evaluación australiano (ACBSS), la norma oficial

chilena sobre canales de bovinos y otros criterios que permitieron registrar la totalidad de las hematomas, que se clasificaron mediante inspección visual de acuerdo con la localización, severidad, tamaño y forma. Se efectuó la medición del pH_{24} en el músculo *Longissimus dorsi* (LD) entre la 14th y 15th costilla, en el lado derecho a 4 cm de profundidad, con un potenciómetro de punzón (IQ150 pH/Mv/medidor de temperatura; IQ Scientific Instruments). El equipo fue calibrado cada cinco muestras, usando dos soluciones estándar de pH 4 y 7, y lavado con agua destilada entre cada medición. Las canales con $pH_{24} < 5,8$ fueron clasificadas como normales; aquellas con $pH_{24} \geq 5,8$ como corte oscuro. Se realizó un análisis de regresión logística multivariada que asumió como variable de respuesta binomial la presencia/ausencia de lesiones usando el programa Stata Versión 11.1 (College Station, Texas, EU). Para explorar los datos se realizaron análisis individuales para cada variable predictora. Las variables seleccionadas se usaron para estimar sus efectos y grado de significancia; aquellos que no presentaron significancia fueron removidas. Los efectos de las variables predictoras sobre la aparición de hematomas se expresaron por medio de las razones de disparidad (OR) y sus respectivos intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con relación a los tiempos de transporte, estos fueron cortos (1.97 ± 0.04 h) y no aumentaron el riesgo de hematomas ($OR=0.94$; $p=0.4$). Algunos investigadores han reportado que las distancias y los tiempos de transporte cortos, no afectan a ocurrencia de hematomas, como es el caso del presente estudio. Se atribuye un aumento en la presencia de las hematomas y en la pérdida de peso vivo a viajes superiores a 12, 24 y 36 h. Sin embargo, en un estudio realizado en Uruguay en 12 plantas de sacrificio de exportación, se encontró que el 60% del ganado presentó por lo menos una lesión, a pesar de que los animales fueron conducidos por tiempos de transporte y distancia cortos (Huertas et al., 2010). Similares resultados fueron reportados en México, en donde se encontró una prevalencia del 92% de hematomas, en animales cuyo tiempo de transporte no superó una hora y los vehículos usados fueron diseñados para el transporte de ganado (Miranda-de la Lama et al. 2011). A pesar de que las densidades de carga de los camiones (352.9 ± 2.0) cumplieron con los requerimientos de la legislación sanitaria colombiana (Resolución 002341 de 2007), esta variable aumentó el riesgo de hematomas en 1.4 veces ($p < 0.01$). El transporte de los bovinos se realiza en camiones de estacas, provistos de carpa, con capacidad para 14 o 15 bovinos, los cuales son separados en dos grupos, por una estaca generalmente de madera que divide el camión en dos compartimentos. En el estudio, los tiempos promedio de permanencia en planta fueron altos (18.9 ± 0.13), los bovinos no fueron reagrupados y se alojaron en instalaciones apropiadas para un adecuado descanso, sin embargo esta variable fue identificada como un factor de riesgo de hematomas ($OR=1.8$). Por otra parte, paradas de los camiones durante el viaje ($OR=1.6$; $p \leq 0.01$), fueron considerados factores de riesgo para la presencia de hematomas. El análisis de la información demostró una relación positiva entre el pH_{24} post-mortem y la presencia de hematomas ($OR=1.5$; $p < 0.01$). Se observaron diferencias significativas en el pH de acuerdo con el tipo de animal, encontrándose pH superiores en los toretes (5.79 ± 0.01). La densidad de carga y las paradas durante el transporte pueden ser factores de riesgo que aumentan la probabilidad de la presencia de corte oscuro en el presente estudio ($p < 0.01$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Huertas, S. M., Gil, A. D., Piaggio, J. M., & van Eerdenburg, F. J. C. M. 2010. *Animal Welfare*, 19: 281-285.
- Miranda-de la Lama, G.C., Leyva, I.G., Barreras-Serrano, A., Pérez-Linares, C., Sánchez-López, E., María, G.A., & Figueroa-Saavedra, F. (2012a). *Tropical Animal Health and Production*, 44: 497-504.
- Miranda-de la Lama, G.C., Villarroel, M., & María, G.A. 2014. *Meat Science*, 98: 9–20.
- Vergara O.D., Elzo M.A., & Ceron-Munoz M.F. 2009. *Livestock Science*, 126: 318-322.

Agradecimientos: Este estudio fue financiado por COLCIENCIAS (proyecto 1127-489-25244), y la Universidad de Caldas.

Tabla 1. Factores de riesgo para la aparición de hematomas en ganado cebú colombiano (n=1179) evaluado en el análisis de regresión logístico

Variable	OR*	ES	IC 95%	Valor p
Tipo de animal	1.0	0.04	0.91 - 1.09	0.9
Tiempo de transporte (h)	0.94	0.42	0.86 - 1.03	0.2
Procedencia (h)	0.60	0.14	0.38 - 0.96	0.03
Permanencia en planta (h)	1.8	0.22	1.41 - 2.30	<0.01
Densidad de carga (Kg/m ²)	1.4	0.14	1.14 - 1.70	0.01
Mezcla de social en el camión	0.32	0.07	1.055 - 1.75	< 0.01
Paradas durante el viaje	1.4	0.06	0.21 - 0.48	<0.01

*OR= Razones de disparidad

Tabla 2. Factores de riesgo para la aparición de corte oscuro en ganado cebú colombiano (n=1179) evaluado en el análisis de regresión logístico.

Variable	OR*	ES	IC 95%	Valor p
Tipo de animal	1.3	0.06	1.20 - 1.45	< 0.01
Tiempo de transporte (h)	1.0	0.27	0.95 - 1.06	0.8
Procedencia (h)	0.75	0.19	0.45 - 1.24	0.3
Permanencia en planta (h)	0.42	0.09	0.27 - 0.66	<0.01
Densidad de carga (Kg/m ²)	1.4	0.14	1.15 - 1.71	<0.01
Mezcla social en el camión	0.67	0.13	0.45 - 1.00	0.05
Paradas durante el viaje	1.6	0.21	1.21 - 2.05	<0.01

*OR= Razones de disparidad

RISK FACTORS INFLUENCING BRUISING AND HIGH MUSCLE PH IN COLOMBIAN CATTLE CARCASSES DUE TO TRANSPORT AND PRE-SLAUGHTER OPERATIONS

ABSTRACT: The aim of this study was investigate risk factors as possible causes for bruising and high muscle pH under commercial operating conditions in Colombia. Data was recorded for 86 journeys referring to 1179 animals. Carcasses were analyzed in terms of muscle pH and bruises (site, size, severity and shape). Our results indicate that truck load density, stops during transportation of cattle and the lairage time at the plant increased the risk of bruises appearing on carcasses. A lairage time of 18 to 24 hour at the plant increased the prevalence of bruises 2.1 times compared to lairage periods of between 12 and 18 hours. Furthermore, intermittent stops during transit are a risk factor for the increase in the incidence of bruises. However, the transport time (up to 4 hours) was not related to the presence of bruises and high muscle pH. Finally, steers were found to have less risk of presenting a high muscle pH.

Keywords: Pre-slaughter operations; Bruises; Higher muscle pH; Zebu cattle.

EFFECTO DE LA CASTRACIÓN SOBRE LOS RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS, LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL Y LA CALIDAD DE LA CARNE DE AÑOJOS DE RAZA TUDANCA

Serrano^{1*}, E., Humada¹, M.J., Castrillo¹, B., Cimadevilla², C. y Chomón², N.

¹Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA), D.G. Desarrollo Rural, Gobierno de Cantabria. C/Héroes 2 de mayo, 27, 39600, Muriedas, Cantabria.

²D.G. de Ganadería, Gobierno de Cantabria. * emmaserrano@cifacantabria.org;

INTRODUCCIÓN

La raza Tudanca es una raza rústica autóctona de Cantabria clasificada “en peligro de extinción” (R.D. 2129/2008). Como raza rústica, sus bajos rendimientos cárnicos y su elevada capacidad para la deposición de grasa, tanto en la canal como en la no canal, desaconsejan, por un lado, el acabado en sistemas intensivos con concentrado a libre disposición, y hacen posible, por otro, el acabado en sistemas semiextensivos en pastoreo con aportes bajos de concentrado (Humada et al. 2013). Las canales de los animales acabados en pastoreo y/o con aportes limitados de concentrado se ven en muchas ocasiones penalizadas económicamente por presentar un nivel de engrasamiento inferior al de animales acabados en sistemas más intensivos, aunque este déficit de engrasamiento de la canal no se corresponda necesariamente con niveles de otros parámetros, como el contenido en grasa intramuscular, que comprometan la calidad organoléptica de la carne. La deposición de grasa en la canal y en la carne depende de varios factores entre los que se encuentran la edad, la raza, el ritmo de crecimiento y el sexo del animal (Micol et al. 1993). Es sabido que la castración favorece la deposición de grasa en la canal y en la carne (grasa inter e intramuscular) pero también que afecta negativamente algunos parámetros de rendimiento productivo como el ritmo de crecimiento (Knight et al. 1999, 2000). El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la castración sobre parámetros productivos, la calidad de la canal y de la carne de añojos y cebones de raza Tudanca.

MATERIAL Y MÉTODOS

La fase de producción se desarrolló en la finca Aranda del Gobierno de Cantabria (Alfoz de Lloredo, 84 m sobre el nivel del mar). Se utilizaron 10 terneros nacidos en la paridera de invierno (**Tabla 1**). Los terneros permanecieron en pastoreo con sus madres hasta el destete en torno a los 6,5 meses de edad. Después del destete los terneros continuaron en pastoreo hasta el 11 de octubre. En esta fecha se introdujeron en una estabulación libre y se alimentaron con silo de hierba a libre disposición (pH 4,20; 28,5% de materia seca y 3,0% GB; 9,2% cenizas; 13,8% PB; 28,5% FB y 56,3% fibra neutro detergente sobre materia seca) y 1,5 kg/animal/día de concentrado comercial (16,5% de PB, 3,2% de GB, 5,6% de FB y 5,7% de cenizas) hasta la salida al pasto el 21 de marzo. El 22 de noviembre se procedió a la castración de 5 terneros. Los animales se asignaron a uno de los dos lotes experimentales (*castrados* y *enteros*) considerando la fecha de nacimiento y el peso vivo en el momento de la castración. La castración se realizó por emasculación con una pinza de Burdizzo. Previamente se aplicó un anestésico local en los cordones espermáticos y un analgésico intramuscular. A partir del 21 de marzo (13,8 meses \pm 21 días de edad) los terneros permanecieron en pastoreo hasta el sacrificio a los 18 meses de edad aproximadamente. El pastoreo se realizó de forma rotacional en dos parcelas con pasto natural de 1,67 y 1,37 ha y los animales se suplementaron con 1,6 kg de cebada (10,5% de PB, 1,4% de GB, 5,5% de FB y 4,0% de cenizas) y 1 kg de pulpa de remolacha deshidratada (9,5% de PB, 0,80% de GB, 19,30% de FB y 8,70% de cenizas) por animal y día. La altura del pasto se midió 1 vez por semana con el objetivo de que la altura media de la hierba disponible no estuviese por debajo de 7 cm. En la **Tabla 1** se muestran las fechas de nacimiento y los pesos y edades de los animales de los dos lotes en el momento del destete y de la castración. Todos los animales se pesaron individualmente cada 15 días y antes de su traslado al matadero el día antes del sacrificio, que se realizó en un matadero comercial situado a 35 km de la explotación. El periodo de espera en el matadero fue de 12 horas. Los sacrificios se realizaron en dos fechas, el 11 de julio (4 animales, 2 castrados y 2 enteros; 112 días de pastoreo) y el 1 de agosto (6 animales, 133 días de pastoreo). 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). Las canales permanecieron en oreo

a T^a ambiente (entre 10 y 13°C) hasta las 7 horas post-sacrificio y a continuación se introdujeron en una cámara con una T^a entre 2 y 4°C. A las 24 h del sacrificio se midió el pH del músculo *Longissimus dorsi* entre la 4^a y la 5^a vértebra lumbar. Se extrajo la chuleta correspondiente a la 6^a costilla y 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 muestras para la determinación del contenido en grasa intramuscular, de los parámetros CIELAB de color (colorímetro Minolta CR-400, iluminante D65, observador 2°) 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 para la determinación del color y de la resistencia al corte se maduraron 7 días envasadas al vacío y en refrigeración. Los lotes se compararon utilizando el procedimiento T-test de comparación de medias del programa SPSS 17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ganancia media diaria de peso vivo en el periodo comprendido desde la castración hasta el inicio del pastoreo (119 días) fue menor ($p \leq 0,01$) en el grupo de animales castrados (**Tabla 2**). El lote enteros presentó también un valor medio más alto de ganancia media diaria de peso vivo en el periodo comprendido desde el inicio del pastoreo hasta el sacrificio, pero las diferencias entre los dos lotes no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en este periodo. Las diferencias en el ritmo de crecimiento se tradujeron en un menor peso vivo al sacrificio ($p \leq 0,05$) y un menor peso de la canal fría ($p \leq 0,05$) del lote castrados. Knight et al. (2000) también observaron un menor ritmo de crecimiento durante un periodo de aproximadamente 4 meses postcastración en terneros castrados entre los 8 y 9 meses de edad. Knight et al. (1999) observaron que las diferencias en el ritmo de crecimiento entre castrados y enteros desaparecían a partir, aproximadamente, de los 9 meses postcastración en terneros castrados en la etapa prepuberal y a partir de los 4-6 meses postcastración en terneros castrados en la etapa postpuberal. La castración no tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre las notas de clasificación por conformación y engrasamiento otorgadas en el matadero (P+ y O-; 5 y 5, respectivamente). Sin embargo, los animales castrados sí presentaron mayor contenido de grasa diseccionable en la 6^a costilla ($p \leq 0,01$) y de grasa intramuscular ($p \leq 0,05$) y una tendencia ($p \leq 0,1$) a valores superiores de peso de la grasa perirenal. Mach et al. (2009) observaron un incremento en las notas de engrasamiento en terneros de raza Frisona, castrados a los 8 meses de edad, sacrificados a los 12 meses de edad y alimentados con pienso a libre disposición, pero no observaron ningún efecto sobre la conformación de la canal. En cuanto a las características de la carne, todas las canales presentaron un pH inferior a 6 a las 24 horas postsacrificio. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de pH entre los dos lotes. La grasa subcutánea de los animales castrados presentó una tendencia ($p \leq 0,1$) a valores inferiores de luminosidad mientras que el músculo *Longissimus dorsi* presentó una tendencia a valores superiores de este parámetro. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), ni el caso de la grasa subcutánea ni en el caso del lomo, en los parámetros a* (índice de rojo) y b* (índice de amarillo). La carne los animales castrados presentó a los 7 días postmortem valores de fuerza máxima de corte inferiores ($p \leq 0,05$) a los de los animales enteros. Estos resultados coinciden en líneas generales con los obtenidos por Mach et al. (2009). Estos autores también observaron un efecto positivo de la castración sobre el contenido en grasa intramuscular, una mayor luminosidad en la carne de los animales castrados y una menor resistencia al corte.

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar indican que la castración puede ser una práctica de manejo interesante para incrementar el engrasamiento de las canales y la carne de machos de raza Tudaanca acabados en sistemas con bajo uso de concentrados y que está práctica tendría también efectos positivos sobre la calidad de la carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Humada, M.J. et al., 2013. ITEA 109: 183-200.
- Knight, T.W. et al., 1999. New Zeal. J. Agr. Res. 42: 269-277.
- Knight, T.W. et al., 2000. New Zeal. J. Agr. Res. 43: 187-192.
- Mach, N. et al., M. 2009. Meat Sci. 81: 329-334.
- Micol, D. et al., 1993. INRA Prod. Anim. 6: 61-69.

Agradecimientos: Personal de la Finca Aranda y del Laboratorio Agrícola del CIFA. Servicio de Laboratorio y Control del Gobierno de Cantabria. Personal y SVO del matadero de Guarnizo. Cooperativa Agrocantabria. Programa DOC-INIA-CCAA 2008 (Emma Serrano).

Tabla 1. Fecha de nacimiento, edad y peso vivo al destete y en el momento de la castración (media \pm desviación estándar) de los dos lotes.

	Castrados (n=5)	Enteros (n=5)	Significación
Fecha de nacimiento	2/2 \pm 29,9	31/1 \pm 17,3	-
Edad al destete (días)	198 \pm 17,4	198 \pm 32,5	n.s.
Peso vivo al destete (kg)	138 \pm 14,0	152 \pm 34,7	n.s.
Edad de castración (días)	294 \pm 30,0	295 \pm 17,3	n.s.
Peso vivo a la castración (kg)	201 \pm 37,5	207 \pm 20,4	n.s.

Tabla 2. Parámetros productivos, calidad de la canal y de la carne de los dos lotes.

	Castrados n=5	Enteros n=5	Desviación estándar	Sig.	
GMDcastración-inicio pastoreo (g/día)	349,2	595,4	89,08	**	
GMD inicio pastoreo-sacrificio (g/día)	755,4	904,2	151,31	NS	
Edad de sacrificio (días)	537,4	538,8	19,22	NS	
Peso vivo sacrificio (kg)	326,6	375,2	27,30	*	
Peso canal fría (kg)	168,2	202,4	17,39	*	
Conformación (1-18)	3,2	3,6	0,71	NS	
Engrasamiento (1-15)	5,0	4,6	0,63	NS	
Peso de la grasa perirenal (g)	3263	2083	852,5	†	
% de grasa de la 6ª costilla	13,4	8,6	2,02	**	
pH 24 h postsacrificio	5,5	5,7	0,18	NS	
% de grasa intramuscular	3,8	2,1	0,93	*	
Fuerza máxima de corte (kg)	4,1	6,3	1,47	*	
Grasa subcutánea	L* a* b*	66,3 2,7 15,4	70,1 4,1 12,8	2,94 1,83 2,87	† NS NS
<i>Longissimus dorsi</i>	L* a* b*	35,2 21,8 4,8	32,8 19,9 3,2	1,90 1,63 1,00	† NS NS

GMD: Ganancia Media Diaria; NS: $P > 0,05$; †: $P \leq 0,1$; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$

EFFECT OF CASTRATION ON PERFORMANCE, CARCASS AND MEAT CHARACTERISTICS OF TUDANCA YOUNG BULLS

ABSTRACT: Ten Tudanca bulls ten months old were divided into two groups, 5 animals were castrated using Burdizzo technique and 5 remained entire. After castration animals were fed on grass silage and concentrate (1,5 kg/animal/day) during 119 days and then finished on pasture and supplemented with 1,6 kg of barley and 1 kg of dehydrated sugar beet pulp per animal and day until slaughter at 18 months of age. Castrated animals showed lower daily weight gain than entire ones during the period comprised between castration and turn-out to pasture ($p \leq 0,05$), but not significant differences ($p > 0,05$) were observed in the period comprised between turn-out to pasture and slaughter. Castrated animals showed lower ($p \leq 0,05$) live weight at slaughter and carcass weight (168 vs 202 kg). The percentage of dissectionable fat from the 6th rib and intramuscular fat content (3,8 vs 2,1%) was higher in castrated vs entire animals while maximum shear force of 7 days matured meat was lower (4,1 vs 6,3 kg; $p \leq 0,05$).

Keywords: steer, fat deposition, grass feeding

EFFECTO DE LA TEMPORALIDAD EN EL APROVECHAMIENTO DE LA MONTANERA SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y CALIDAD DE CANAL DE CERDO IBÉRICO

García-Torres, S., Pérez, M., Martín-Tornero, E., Cabeza de Vaca, M., López-Gajardo, A., Prior, E., Contador, R., Osorio, C., Cava, R., Cantero, V., Ladero, L. y Tejerina*, D. CICYTEX (Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura). A5, km 472. 06187 Guadajira (Badajoz)

*tejerinabarrado@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

La producción de cerdo Ibérico asociada a la dehesa en extensivo durante el periodo de Montanera (1 de octubre a 31 de marzo), coincidiendo con la disponibilidad de bellota, con aprovechamiento exclusivo de los recursos naturales “ad libitum” y en libertad de movimiento, supone un sistema único del Suroeste de la Península Ibérica, concentrándose en Extremadura el 49,35% de la producción española (MAGRAMA 2013). Bajo este sistema de producción se obtienen productos cárnicos de una alta calidad, siendo especialmente valorados por los consumidores, y con un alto precio de mercado, los productos curados de partes nobles (jamón, paleta y lomo) (Espárrago *et al.*, 2001).

Parte de la calidad de estos productos es debida a la calidad nutritiva del alimento disponible para el cerdo Ibérico durante su engorde en montanera, siendo la bellota y el pasto la base de su dieta durante la fase final de engorde (Rodríguez Estévez *et al.*, 2009). Sin embargo, la composición nutritiva de estos recursos naturales es variable entre años e incluso a lo largo de un mismo periodo de montanera (Tejerina *et al.*, 2010), pudiendo tener efectos sobre los parámetros productivos y la calidad de los productos finales (Rey *et al.*, 2006).

Actualmente tanto las condiciones de producción como la elaboración de los productos cárnicos de cerdo Ibérico están regulados a nivel nacional por el Real Decreto 4/2014. En este sentido, dicha normativa establece para el sistema de Montanera del cerdo Ibérico una fase final de engorde en extensivo basado exclusivamente en los recursos naturales de la dehesa durante más de 60 días. Los pesos en fresco del jamón, la paleta y el lomo no aparecen contemplados en dicha normativa, estando regulados sin embargo los pesos finales de los productos curados en jamones y paletas.

Con todo ello, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la temporalidad del aprovechamiento de la Montanera (Temprana, Media y Tardía) sobre los parámetros productivos y la calidad de la canal del cerdo Ibérico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se emplearon 36 cerdos Ibéricos puros de la línea Valdesequera de 105 ± 6 kg de peso vivo distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales (12 animales/lote). La fase final de engorde, en todos ellos, se estableció en periodos de al menos 60 días en Montanera, con diferentes fechas de inicio de la misma: Montanera Temprana (MT), desde 1 de noviembre hasta el 31 de diciembre; Montanera Media (MM), desde el 1 de diciembre hasta el 31 de enero y Montanera Tardía (MTA), desde el 1 de enero hasta el 28 de febrero. Los animales se sacrificaron cuando alcanzaron los 150 ± 10 kg de peso vivo.

Se estudiaron tanto indicadores relacionados con parámetros productivos como el peso inicial (PI), ganancia media diaria (GMD), índice de conversión (IC) y peso final (PF), así como con la calidad de canal, como el peso canal, rendimiento de la canal, espesor de la grasa subcutánea dorsal en tres localizaciones anatómicas (a nivel de la primera costilla (E1), última costilla (E2) y caudal (E3)) y los pesos y rendimientos de las piezas nobles (jamones, paletas y lomos).

El efecto de la temporalidad del periodo de engorde en Montanera se determinó mediante un análisis univariante de la variancia (ANOVA de una vía) utilizando el software estadístico SPSS, determinándose las diferencias entre grupos a través de un test de Tukey. Las diferencias se establecieron para un nivel de significación para un $p \leq 0,05$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de producción obtenidos se muestran en la Tabla 1. Se observaron diferencias significativas en el peso inicial ($p < 0,001$), de manera que los animales de la MTA presentaron mayor peso inicial que los otros dos lotes. El peso final fue similar en los tres

lotes ($p>0,005$). El lote MTA mostró el menor valor de GMD y el mayor de IC, probablemente debido a la disminución de la calidad nutritiva del alimento disponible al final de la Montanera (Tejerina *et al.*, 2011).

Tabla 1. Efecto del sistema de producción sobre los parámetros productivos de cerdos Ibéricos Línea Valdesequera

	Montanera Temprana	Montanera Media	Montanera Tardía	EEM	Sig.
Datos Productivos					
Peso Inicial (kg)	99,3b	102,8b	111,4a	1,22	***
GMD (kg)	0,7a	0,6a	0,4b	0,03	***
IC (kg)	12,4b	15,0b	21,2a	1,02	***
Peso Final (kg)	146,6	144,7	140,2	1,60	ns

EEM, error estándar de la media; GMD, ganancia media diaria; IC, índice de conversión.

Sig.: niveles de significación dados por ***($p\leq 0,001$), **($p\leq 0,01$), * ($p\leq 0,05$), ns (no significativo, $p>0,05$).

a, b, c, diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas ($p\leq 0,05$) entre los diferentes sistemas de producción utilizados

Los resultados de los parámetros de calidad de la canal se muestran en la Tabla 2. Aunque el peso vivo de sacrificio de los tres lotes fue similar ($P>0,05$), el lote MTa mostró pesos de canal significativamente menores ($p<0,01$). Sin embargo, los rendimientos de canal fueron diferentes entre los tres lotes, de manera que los mayores valores aparecen asociados al lote MM y los menores a MTa, encontrándose rendimientos intermedios en el lote MT ($P<0,001$). En relación al rendimiento total de las piezas nobles, éste fue similar para los tres lotes, por lo que el lote MTa mostró los menores pesos tanto para jamón, como para paleta y lomo.

Tabla 2. Efecto del sistema de producción sobre los parámetros de canal de cerdos Ibéricos Línea Valdesequera

	Montanera Temprana	Montanera Media	Montanera Tardía	EEM	Sig.
Datos Canal					
Peso Canal (kg)	126,50a	127,32a	117,94b	1,497	**
Rto Canal (%)	86,33b	87,99a	84,10c	0,305	***
Espesor grasa dorsal					
E1 (1ª Costilla) (cm)	8,33b	9,11b	10,22a	0,187	***
E2 (última costilla) (cm)	5,69b	6,50a	6,54a	0,159	*
E3 (Caudal) (cm)	7,31a	6,00b	6,07b	0,179	***
Peso/Rendimiento piezas nobles					
Peso Jamones (kg)	25,54ab	26,19a	24,27b	0,273	**
Peso Paletas (kg)	17,51a	16,94ab	16,07b	0,246	*
Peso Lomos (kg)	3,57a	3,44ab	3,14b	0,061	**
Rto Piezas nobles (%)	36,91	36,61	36,89	0,189	ns

EEM, error estándar de la media; Sig: niveles de significación dados por ***($p\leq 0,001$), **($p\leq 0,01$), * ($p\leq 0,05$), ns (no significativo, $p>0,05$).

a, b, c, diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas ($p\leq 0,05$) entre los diferentes sistemas de producción utilizados.

En cuanto a la grasa subcutánea dorsal, los mayores espesores aparecen asociados a la altura de la primera costilla (E1). El sistema de producción tuvo efecto significativo ($p\leq 0,05$) sobre los tres parámetros estudiados (E1, E2 y E3), pero el comportamiento sobre cada uno de ellos resultó diferente. De esta manera, para la medida a la altura de la primera costilla

(E1) los mayores valores aparecen en el lote MTa, mientras que el lote MT mostró los menores espesores de grasa subcutánea a la altura de la última costilla (E2) y los mayores a la altura caudal (E3).

Las diferencias observadas en los parámetros de estudio bajo los tres sistemas de aprovechamiento, podrían ser debidos a factores relacionados con el propio sistema de producción en extensividad de la Montanera, tales como: i) la calidad y cantidad de la dieta en un sistema ad libitum (Diéguez, 1992; Tejerina *et al.*, 2010; 2011); ii) el metabolismo energético relacionado con el ejercicio físico, las condiciones orográficas del terreno o las condiciones climáticas (Santomá 1997, López-Bote *et al.* 2000, Rodríguez Estévez 2010).

En conclusión, se observa que la temporalidad en el aprovechamiento de la Montanera afecta significativamente a los parámetros productivos y la calidad de la canal del cerdo Ibérico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Espárrago *et al.*, 2001. Porcino ibérico: aspectos claves. Mundi Prensa, Madrid. pp. 535-588.
- Diéguez, E. 1992. Simposio del cerdo Ibérico. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: 9-35.
- López Bote *et al.*, 2000. XVI Curso de Especialización FEDNA: 77-111
- Rey *et al.*, 2006. Meat Science 73: 66–74.
- Rodríguez Estévez *et al.*, 2009 Livestock Science 120: 135–143.
- Rodríguez Estévez *et al.*, 2010. Livestock Science 132: 152–156.
- Santomá, 1997. XIII Curso de Especialización FEDNA: 100-131.
- Tejerina *et al.*, 2010. Spanish Journal of Agricultural Research 8(3): 634-641.
- Tejerina *et al.*, 2011. Food Chemistry 124: 997–1004.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto RTA2011-00035-C02-00. Los autores quieren agradecer a la sección de porcino del CICYTEX.

EFFECT OF DIFFERENT DATE OF MONTANERA FREE-RANGE SYSTEM ON GROW PERFORMANCE AND SOME QUALITY CARCASS TRAITS OF IBERIAN PIGS.

ABSTRACT: The meat from Iberian pigs reared in Montanera free-range system is one of the most appreciated nationally and internationally. The diet based on consumption of acorns and grass and the system of extensive production, among others, contribute to these quality characteristics. But previous studies demonstrated that the quality of natural resources (acorns and grass) of the Dehesa ecosystem was variable during the Montanera. so, the main aim was to study the three different date of the beginning of Montanera system for the final phase of fattening (early, middle and late) on growth performance and carcass quality. For this, three batches of 12 Iberian pigs per group were established and reared under early, middle and late Montanera system. The results showed that there were differences between production systems proposed in most of the parameters studied. So we could emphasize that a late use of Montanera results in a lower average daily gain, higher conversion rate and lower carcass yield and weight of commercial pieces.

Keywords: Iberian pigs, Montanera, system production, carcass quality

RELACION ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS DEL PLASMA SANGUÍNEO Y LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDOS DUROC.

Tor¹, M., Tamayo¹, K., Tamayo¹, S., Vilaró², F., Ros-Freixedes¹, R., Gol¹, S., Henríquez¹, E., Álvarez-Rodríguez¹, J., Pena¹, R.N., Estany¹, J.

¹Departament de Producció Animal. ²Serveis Científico-tècnics. Universitat de Lleida-Centre Agrotecnio. Avenida Rovira Roure 191. 25198. Lleida. Mtor@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El perfil de ácidos grasos de la sangre ha sido ampliamente utilizado como marcador en estudios de riesgo de determinadas enfermedades. Se conocen los valores de referencia de la composición de los lípidos del plasma y también el efecto que sobre ellos tiene la grasa ingerida. Sin embargo, en estado de ayuno, se ha observado que se incrementa notablemente el contenido de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma, debido al catabolismo del tejido adiposo. En este estado, se ha sugerido la posibilidad de utilizarlos como marcadores de la composición, ya no de la dieta, sino del tejido adiposo (Hodson et al., 2012). En estudios de calidad de carne, son escasos los datos de evolución de la composición de la grasa, puesto que es necesaria la toma de muestras mediante biopsia, con los consiguientes problemas de manejo y bienestar animal. Por ello sería interesante conocer la viabilidad de utilizar los valores de NEFAs plasmáticos para predecir la composición del tejido adiposo, especialmente el intramuscular. En este trabajo se plantean tres objetivos: (i) caracterizar los valores de los NEFAs plasmáticos en cerdos de la raza Duroc y describir el efecto que tiene sobre ellos la edad del animal y el tiempo de ayuno; (ii) determinar la relación entre los NEFAs plasmáticos y el tejido adiposo intramuscular; y (iii) evaluar el efecto de un polimorfismo en el gen de la enzima Estearoil-CoA desaturasa sobre el perfil de los NEFAs plasmáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 160 cerdos machos castrados y sacrificados a los 210 días de edad, pertenecientes a una población de raza Duroc (Selección Batallé, Riudarenes, Girona), distribuidos en dos lotes espaciados en el tiempo. El peso medio de la canal fue de 101,3kg y el porcentaje de magro medido por AUTOFOM[®] (SFK-Technology, Herlev, Dinamarca) de 41,36%. A los 180 días de edad se realizó una extracción de sangre de la vena yugular tras un ayuno de 12 horas. El día del sacrificio se obtuvo una segunda muestra de sangre distribuyendo los animales en dos periodos de ayuno de 12 o 24 horas. A las 24 horas *post-mortem* se obtuvo una muestra del *m.glutaeus medius* de todas las canales y una muestra de *m. longissimus dorsi* de 40 canales de cada lote elegidas aleatoriamente. Éstas se conservaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Los animales se genotiparon para un polimorfismo en la región promotora (haplotipos H1 y H2) del gen que codifica la enzima estearoil-CoA desaturasa (Estany et al. 2014). La extracción de los NEFA se realizó según Helmuth et al. 2012. La cuantificación de los NEFAs plasmáticos se llevó a cabo en un espectrómetro de masas acoplado a un sistema de cromatografía de líquidos UPLC-XevoTQS (Waters, Mildford, USA), equipado con una fuente de ionización por electrospray y una columna de fase reversa ACQUITY UPLC HSS –T3 (2,1 x 150 mm; 1,8 µm de tamaño de partícula). La fase móvil fue un gradiente de agua/isopropanol/acetoneitrilo. Se construyó un método de reacción múltiple monitorizada (MRM) con una función para cada uno de los ácidos grasos a determinar. La cuantificación se hizo con patrones en pureza y como matriz plasma porcino depletado de grasa, según el método propuesto por Cham et al. (2005). La composición de ácidos grasos del tejido adiposo intramuscular se determinó por cromatografía de gases (Bosch et al., 2009). Los datos se analizaron con el paquete estadístico Jmp Pro 11 (SAS Institute, Cary, NC, EEUU) mediante un modelo que incluyó el peso de la canal, el lote (1 y 2 separados en el tiempo), el tiempo de ayuno (12 y 24 horas) y genotipo del gen *SCD* (H1 y H2). La comparación de medias se realizó con un test t-Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con Fayn et al (1994), se observa un claro efecto del ayuno sobre el contenido de NEFAs plasmáticos en todos los ácidos grasos excepto el 15:0 (Figura 1). Para el ácido oleico, supone un aumento de prácticamente un 15% entre las 12 y 24 horas de ayuno. Se comprueba por tanto, en este tipo de animales, la movilización del tejido adiposo tras un periodo de ayuno. Este incremento en los NEFAs plasmáticos, tiene un efecto poco relevante sobre su composición. En la Tabla 1 se puede observar que a pesar que hay diferencias significativas en los porcentajes de algunos NEFA entre las 12 a las 24 horas de ayuno, éstas no afectan a los ácidos grasos mayoritarios (oleico, esteárico, palmítico y linoleico), ni tampoco tienen repercusión sobre el grado de insaturación total. Por el contrario la edad del animal, si tiene un efecto relevante sobre la composición de los NEFAs. De los 180 a los 210 días de vida, baja significativamente el ratio de ácidos grasos monoinsaturados/saturados (MFA/SFA), a causa de un decremento considerable de los ácidos oleico y palmítico y a un aumento del ácido esteárico. En cuanto a la relación entre la composición de la grasa intramuscular y el perfil de los NEFAs plasmáticos (Tabla 2), es de destacar una correlación significativa, consistente entre músculos, para los ácidos grasos 18:0, 16:1 a las 12 horas de ayuno y del 18:3 a las 24 horas. Aun así, no se ha observado un patrón de correlaciones fenotípicas claro, ni un efecto del tiempo de ayuno sobre el mismo, que permitan construir un modelo de predicción.

Tabla 1. Efecto del tiempo de ayuno, de la edad del animal y del genotipo SCD sobre el perfil porcentual de ácidos grasos no esterificados en plasma sanguíneo.

	Edad		Ayuno		Genotipo SCD	
	180 días	210 días	12 horas	24 horas	H1H1	H2H2
14:0	0.8±0.02 ^a	0.7±0.02 ^b	0.7±0.02	0.7±0.01	0.7±0.03	0.7±0.02
15:0	0.2±0.01 ^a	0.4±0.01 ^b	0.3±0.02 ^a	0.2±0.01 ^b	0.3±0.02	0.3±0.01
16:0	16.2±0.35	16.1±0.37	16.3±0.35	16.2±0.26	16.4±0.48	16.5±0.32
18:0	20.0±0.42 ^b	22.1±0.46 ^a	21.9±0.44	21.1±0.33	20.6±0.60 ^b	22.4±0.41 ^a
20:0	0.2±0.01 ^b	0.3±0.01 ^a	0.3±0.01 ^a	0.2±0.00 ^b	0.2±0.01	0.3±0.01
16:1	2.8±0.12 ^a	2.4±0.13 ^b	2.4±0.11 ^b	3.1±0.08 ^a	2.9±0.15	2.5±0.10
18:1	44.4±0.58 ^a	41.8±0.63 ^b	41.9±0.62	42.3±0.47	42.8±0.84	41.1±0.57
18:2	11.8±0.28	11.6±0.30	11.5±0.33	11.3±0.25	11.4±0.46	11.3±0.31
18:3	1.0±0.04	0.9±0.04	0.9±0.03	1.1±0.03	1.0±0.05	0.9±0.03
20:2	0.4±0.01 ^a	0.2±0.01 ^b	0.2±0.01 ^b	0.3±0.01 ^a	0.3±0.01	0.3±0.01
20:4	1.6±0.19 ^b	3.0±0.21 ^a	3.0±0.22	3.0±0.17	2.9±0.31	3.2±0.21
16:1/16:0	0.1±0.00 ^a	0.1±0.01 ^b	0.1±0.01 ^b	0.2±0.01 ^a	0.2±0.01 ^a	0.1±0.01 ^b
18:1/18:0	2.2±0.06 ^a	1.9±0.06 ^b	1.9±0.06	2.0±0.04	2.1±0.08 ^a	1.8±0.05 ^b
MFA/SFA	1.3±0.03 ^a	1.1±0.03 ^b	1.1±0.03	1.2±0.02	1.2±0.04 ^a	1.1±0.03 ^b

Letra distinta en dentro de fila indica diferencias significativas ($P < 0,05$) para de cada factor.

El objetivo de determinar la correlación entre los NEFA plasmáticos y la grasa intramuscular, es tratar de predecir la evolución de esta última. Desde un punto de vista fisiológico, quizás sería interesante incluir en el modelo otros depósitos adiposos como son el subcutáneo y los viscerales. En concordancia con lo observado en otros tejidos (Estany et al. 2014), se ha detectado un efecto del polimorfismo estudiado de la esteroil-CoA desaturasa sobre los NEFAs plasmáticos. Se observa un incremento del ratio MFA/SFA en los animales H1H1 respecto a los H2H2 (Tabla 1).

Tabla 2. Correlación del contenido de ácidos grasos libres plasmáticos con el perfil de la grasa intramuscular de los músculos *m. longissimus dorsi* y *m. gluteus medius*.

	<i>m. longissimus dorsi</i>		<i>m. gluteus medius</i>	
	12 horas	24 horas	12 horas	24 horas
14:0	0,191 ^{ns}	0,342 [*]	0,400 ^{**}	0,122 ^{ns}
16:0	0,028 ^{ns}	0,261 ^{ns}	-0,175 ^{ns}	0,331 ^{**}
18:0	0,363 [*]	0,321 ^{ns}	0,314 [*]	0,250 [*]
20:0	0,217 ^{ns}	0,319 ^{ns}	-0,086 ^{ns}	0,152 ^{ns}
16:1	-0,373 [*]	-0,156 ^{ns}	-0,329 [*]	-0,099 ^{ns}
18:1	0,023 ^{ns}	0,188 ^{ns}	0,092 ^{ns}	0,244 [*]
18:2	0,313 ^{ns}	-0,024 ^{ns}	-0,059 ^{ns}	-0,143 ^{ns}
18:3	0,315 ^{ns}	0,626 ^{***}	0,353 ^{**}	0,586 ^{***}
20:2	0,245 ^{ns}	-0,096 ^{ns}	-0,569 ^{***}	-0,560 ^{***}
20:4	0,206 ^{ns}	-0,336 ^{ns}	0,038 ^{ns}	-0,254 [*]

***=P<0,001; **=P<0,01; *=P<0,05; ns= no significativo P>0,05.

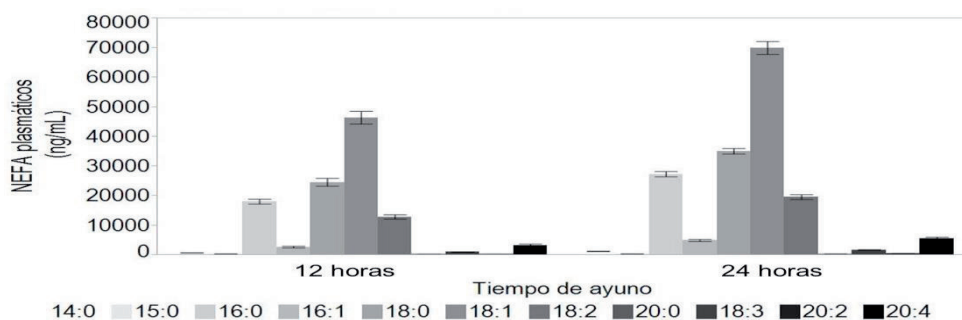


Figura 1. Contenido de NEFAs plasmáticos con ayunos de 12 y 24 horas. Todas las diferencias entre tiempos de ayuno son significativas ($p<0,0001$) excepto para el ácido graso 15:0 que no es significativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bosch, L., et al., 2009. Meat Sci. 82: 432-437
- Cham, B. et al., 2005. J Clin Apheresis. 20: 143-153
- Estany, J., et al., 2014. PLoS One. 2014; 9(1): e86177.
- Fayn, K.N., 1994. Am J Physiol. 266:E308-17.
- Hellmuth, C., 2012. Anal Chem. 84: 1483-1490.
- Hodson, L. et al, 2008. Prog Lipid Res. 47: 348-380

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2012-33529).

RELATIONSHIP BETWEEN PLASMATIC NON ESTERIFIED FATTY ACIDS AND INTRAMUSCULAR FAT IN DUROC PIGS.

ABSTRACT: Blood NEFA analysis could be a useful in vivo tool to predict lipid tissue composition. This work evaluated the effect of fasting period and age on the blood NEFA profile of Duroc heavy pigs. The results showed that the main NEFA (oleic, stearic, palmitic and linoleic) were not affected by fasting period, which did not alter their saturation degree. However, the proportion of blood MFA/SFA ratio decreased from 180 to 210 days of age due to decreasing content of oleic and palmitoleic and increasing content of stearic acids. The greatest correlation between individual intramuscular (longissimus dorsi and gluteus medius) fatty acids and blood NEFA was observed for stearic and palmitoleic acids after 12 h of fasting and linolenic acid after 24 h of fasting. Nevertheless, the phenotypic correlation pattern did not allow defining at present a precise prediction model.

Keywords: pigs, blood NEFA, intramuscular fat.

SENSORES NIRS PORTÁTILES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INDIVIDUALIZADO DE JAMONES DE CERDO IBÉRICO ANTES Y DESPUÉS DE LA SALAZÓN

Fernández-Navales, J., 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. *pa1pesae@uco.es

INTRODUCCIÓN

Los jamones de cerdo Ibérico de montanera tienen una alta reputación nacional e internacional, no sólo por las características organolépticas y las propiedades saludables del producto, sino también por estar basados en un sistema de producción sostenible, aprovechando los recursos naturales de la dehesa (Garrido y De Pedro, 2007). Por otra parte, cada día hay más preocupación en el consumidor por la ingestión de sal y su repercusión en la salud, asociados con problemas de hipertensión, entre otros (He & MacGregor, 2003). El proceso de curado del jamón requiere que las piezas estén un periodo de tiempo mínimo sometidos a la acción de la sal, siendo determinantes este tiempo de salazón y las características de la grasa y el músculo de los jamones, tanto en el proceso tecnológico, como en el contenido en sal y su la calidad organoléptica final (Andrés *et al.*, 2004; Gou y Comaposada, 2002). En las características de los depósitos grasos del cerdo ibérico, la alimentación va a ser determinante (Cava *et al.*, 2000, De Pedro, 2008 y Ventanas *et al.*, 2007), destacando además Timón *et al.* (2001) que estas características de la grasa fresca siguen manteniéndose en la grasa del jamón curado. Por ello, es importante conocer las características del producto antes de comenzar el proceso de elaboración. En muchas industrias, los jamones son adquiridos en fresco, sin conocerse con fiabilidad las características individuales de cada uno de ellos; sólo se tiene la información de la evaluación global del lote de animales, en base al informe de inspectores de campo, existiendo variaciones importantes entre individuos (De Pedro y García Olmo, 1999). La caracterización individual de los jamones, antes y después del comienzo del proceso de salazón, permitiría a las industrias conocer, de forma fiable, el tipo de producto del que parte y diseñar el proceso de curación adecuado a las características del producto. Estudios previos han mostrado que se puede determinar el régimen alimenticio mediante espectroscopía NIRS en grasa subcutánea y en músculo de la canal (De Pedro *et al.* 2007; Garrido *et al.* 2013). El objetivo del presente trabajo es doble, de una parte evaluar un instrumento portátil MEMS-NIRS, como herramienta para implementar un sistema de reconocimiento, rápido y no destructivo, de jamones de cerdo ibérico durante el proceso de salazón y, asimismo, establecer la zona más adecuada para esta caracterización.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 367 jamones de cerdos Ibéricos sacrificados en la campaña 2011/2012, de los cuales 207 fueron alimentados con pienso (Cebo) y 160 aprovechando los recursos de la montanera (Bellota); la edad de sacrificio fue de 12 y 15 meses, respectivamente. La salazón se realizó en cámara a 4 °C y HR del 95 %, permaneciendo los jamones recubiertos de sal durante un número de días equivalente al peso de los jamones más 1.

Las medidas espectrales fueron tomadas en dos zonas diferentes del jamón, sobre la zona superficial del músculo *Adductor* y sobre el tejido adiposo que recubre la zona de la maza, durante las etapas de entrada y salida de salado. Dichas medidas se realizaron 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 resultado de promediar 5 medidas espectrales. El tiempo de integración del sensor fue de 600 ms. La temperatura de las muestras durante la medición osciló entre 8 y 10 °C.

Previamente al desarrollo de modelos de clasificación, se realizó una estructuración de los datos mediante un Análisis por Componentes Principales, calculando posteriormente las distancias de Mahalanobis al centro de la población. Se ha utilizado como criterio para considerar un espectro anómalo, la existencia de una distancia al centro mayor que 3 (Shenk y Westerhaus, 1991, 1996). Para el tratamiento quimiométrico de los datos espectroscópicos generados se empleó el software WinISI II versión 1.05 (ISI, 2000). Se

obtuvieron modelos de clasificación PLS-DA (Partial Least Square – Discriminant Analysis), con el objeto de diferenciar las muestras en función del régimen alimenticio (Bellota & Cebo), en cada una de las zonas del pernil y a la entrada y salida del proceso de salazón. Se asignaron de forma arbitraria los valores 1 y 2 para cada una de las clases y se utilizó el valor de corte de 1,5, atendiendo a las recomendaciones de McElhinney *et al.*, (2000) y Downey, (1994).

Para cada uno de los modelos PLS-DA, se evaluaron diferentes pretratamientos de la señal, MSC (Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión), una combinación del SNV + Detrending y la no corrección de la dispersión, así como diferentes derivadas según las indicaciones de Shenk y Westerhaus (1996).

La exactitud de los modelos fue evaluada, mediante el cálculo del porcentaje de muestras correctamente clasificadas, tanto para el modelo global como para cada uno de los grupos individuales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mejores modelos de discriminación desarrollados para evaluar la aplicabilidad del equipo portátil MEMS en la caracterización de jamones de cerdo ibérico se muestran en la Tabla 1. Se observa que todos los modelos desarrollados clasifican correctamente un porcentaje elevado de jamones superior al 83,9 %, tanto antes de la entrada y salida de salazón como en la salida. En general, se observan mayores porcentajes de aciertos, cuando los espectros se registran sobre jamones antes del salado (96,5 %, 98,9 %, en músculo y 98,6 %, 96,1 % en tejido adiposo) frente a la obtención del espectro en jamones tras el salado (83,9 % y 85,9% en músculo y 97,9 % y 93,2 % en tejido adiposo).

Un análisis más detallado de los datos de la Tabla 1 nos revela que en el caso de realización de la medida en el tejido adiposo, los resultados para las dos etapas (entrada y salida de salado) son similares y con porcentajes de aciertos muy elevados en ambos casos (> 96 % previo a salazón y > 93 % después del salado). Igualmente, cuando las medidas se realizan en el músculo *Adductor*, el porcentaje de muestras correctamente clasificadas es inferior a la salida de salado (> 83 %) en relación a la medida en músculo sin salar (> 96 %). Esto podría explicarse por presencia de agua residual en el jamón, como consecuencia del proceso de lavado de perniles, así como a la interferencia causada por la presencia de sal en el músculo.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman el alto potencial de los sensores portátiles MEMS-NIRS para el control no destructivo de jamones individuales, aportando además una información adicional de gran interés científico y tecnológico, como es la posibilidad de realizar este control no solo a nivel de la canal, como indican Zamora *et al.*, (2012), sino también durante el proceso crítico de salado, permitiendo a los industriales del sector optimizar el proceso de curación, con el fin de lograr una óptima curación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.I. Andrés, A.I., Cava R., Ventanas, J., Tovar, V. & Ruiz J. 2004. *Meat Sci.* 68: 45–51.
- Cava, R., Ventanas, J., Ruíz, J., Andrés. A.I. & Antequera, T. 2000. *Food Sci Technol Int.* 6: 235-242.
- De Pedro, E.J., & García Olmo, J. 1999. *Solo Cerdo Ibérico.* 3: 89-94.
- De Pedro, E., De La Haba, M.J., García, J., Garrido, A. & Nuñez N., 2007. 5th International Symposium of the Mediterranean Pig. pp. 219-223.
- De Pedro, E. 2008. *El Cerdo Ibérico: una revisión transversal*. J. Forero (Coord.). pp 353-375.
- Downey, G. 1994. *Analyst.* 119: 2.367-2.375.
- He, F. J., & MacGregor, G. A. 2003. *Hypertension*, 42: 1093–1099
- Garrido-Varo, A. & De Pedro, E. 2007. *Handbook of Near-Infrared Analysis.* pp. 387–397.
- McElhinney, J. Downey, G. & Fearn, T. 2000. 9th International Conference on Near Infrared Spectroscopy. pp. 511-515.
- Gou, G., & Comaposada, J.. 2002. *Eurocarne*, 105: 85–96.
- Shenk, J.S. & Westerhaus, M.O. 1991. *Crop Sci* 31: 469-474.
- Shenk, J.S. & Westerhaus, M.O. 1996. *Near infrared spectroscopy: The future waves* pp. 198–202.
- Timón, M. L., Martín, L., Petró, M.J., Jurado, A. & García, C. 2001. *J. Sci. Food Agric.* 82: 186–191.
- Ventanas, S., Ruíz, J., García, C. & Ventanas, J. 2007. *Meat Sci.* 77: 324–330.
- Zamora-Rojas, E. *et al.* 2012. 7th International Symposium on the Mediterranean Pig. pp. 551–555.

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.), así como la colaboración técnica de M^a Carmen Fernández Fernández, Antonio López López y Manuel Sánchez Calderón del Dpto. de Producción Animal.

Tabla 1. Porcentaje de muestras correctamente clasificadas con los mejores modelos PLS-DA obtenidos para los diferentes pre-tratamientos y zonas de medida

		Etapas del proceso de elaboración			
		Entrada en Salazón		Salida en Salazón	
Zona	Grupos de clasificación	Bellota (n= 143*)	Cebo (n= 177*)	Bellota (n= 143*)	Cebo (n= 177*)
Músculo Adductor	Bellota	138	2	120	25
	Cebo	5	175	23	152
	Correctamente clasificado (%)	96,5	98,9	83,9	85,9
		Entrada en Salazón		Salida en Salazón	
Tejido adiposo	Grupos de clasificación	Bellota (n= 143*)	Cebo (n= 177*)	Bellota (n= 143*)	Cebo (n= 177*)
	Bellota	141	7	140	12
	Cebo	2	170	3	165
	Correctamente clasificado (%)	98,6	96,1	97,9	93,2
		Entrada en Salazón		Salida en Salazón	

*número de muestras una vez eliminados los espectros anómalos

PORTABLE NIR SENSORS FOR INDIVIDUAL CONTROL OF IBERIAN PIG HAMS BEFORE AND AFTER THE SALTING PROCESS.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the potential of a portable NIRS instrument for the authentication of Iberian pig hams, both at the beginning and at the end of the salting process. The high precision reached by the classification models prior to the salting process suggests that the NIR spectral range (1600-2400 nm) contains information that will make possible to precisely differentiate and define the animal's feeding regime, based both on the fat (> 96 % of correct classification) as well as on the muscle in the hams (> 83 % of correct classifications) with great accuracy. This would provide the industry with the tools to control the quality of the raw material it receives and would allow producers to design a production process suitable for the characteristics of the product.

Keywords: feeding regime, iberian ham, MEMS device, salting process

META-ANÁLISIS DEL EFECTO DEL PASTOREO VERSUS LA CRIANZA INTENSIVA EN LOS ÁCIDOS GRASOS SATURADOS EN LA CARNE DE CORDERO

Popova¹, T., Gonzales-Barron², U. y Cadavez², V.

¹Institute of Animal Science, 2232 Kostinbrod, Bulgaria

²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. Campus de Santa Apolónia, Bragança. Portugal.

*tpopova@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La cantidad de grasa en la dieta humana, y especialmente el contenido de ácidos grasos saturados son de suma importancia porque son considerados como un riesgo principal de enfermedades coronarias. La carne de rumiantes tiene un tenor relativamente alto de ácidos grasos saturados debido al proceso de biohidrogenación, y por tanto se le considera como menos saludable. Aunque las posibilidades de alterar la composición de ácidos grasos en los rumiantes son mucho más limitadas que en los mono-gástricos, existen trabajos que estudian la manipulación del perfil de lípidos a través de varias estrategias de alimentación y sistemas de crianza (Bas, Morand-Fehr, 2000; Wood *et al.*, 2008). Se ha reportado el efecto beneficioso del pastoreo en la composición lipídica de las carnes de rumiantes, principalmente incrementando el contenido de n-3 PUFA (Gatellier *et al.*, 2005; Cividini *et al.*, 2014). Existen muchas narrativas cualitativas del efecto de los sistemas de crianza y alimentación en el perfil lipídico de la carne. Tales revisiones son de naturaleza subjetiva y no extraen conclusiones que tengan en cuenta la variabilidad entre los estudios. El uso de meta-análisis permite determinar cuantitativamente los efectos y su precisión, aún cuando los resultados sean opuestos (Fernandez-Duque, 1997). El objetivo de este estudio fue el de cuantificar el efecto de la crianza por pastoreo en los ácidos grasos saturados de la carne de cordero a través de un enfoque meta-analítico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda computarizada de literatura, usando diversos sitios web, para seleccionar los estudios publicados sobre el efecto del pastoreo versus la crianza intensiva en el contenido de ácidos grasos saturados en la carne de cordero. Se incluyeron 17 estudios en el meta-análisis. En todo meta-análisis, es necesario definir un tamaño de efecto, que en este caso, mida la influencia del pastoreo en la variable de respuesta. El tamaño de efecto definido fue la diferencia entre medias para los corderos sujetos a pastoreo y aquellos sujetos a crianza intensiva. Un valor positivo indicará que la crianza intensiva presenta valores más altos de la variable en cuestión, mientras que un valor negativo indicará que los corderos sujetos a pastoreo producen carne de menor tenor en ácidos grasos saturados. Debido a la alta heterogeneidad entre estudios, se optó por un modelo de efectos aleatorios para evaluar la influencia del pastoreo versus la crianza intensiva. El gráfico de 'forest plot' fue utilizado para visualizar los tamaños de efecto de cada uno de los estudios así como del efecto promedio total. El modelo meta-analítico se ajustó usando el paquete 'Metafor' en el software estadístico R versión 2.14.2 (R Development Core Team).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El modelo meta-analítico concluyó que existe una influencia del sistema de crianza sobre la cantidad total de ácidos grasos saturados en la carne de cordero. Aunque unos pocos estudios (4 de 17) reportaron contenidos más bajos de ácidos grasos saturados en corderos de pastoreo (Fig. 1), el efecto total indicó que el acceso al pastoreo incrementa de forma significativa ($P < 0.05$) la saturación de los lípidos en los músculos de los corderos. También se observó que los corderos criados extensivamente sin concentrados y sin leche, tienden a presentar valores más altos ($P < 0.01$) de ácidos grasos saturados. El mayor contenido de estos ácidos grasos en los corderos al pastoreo indica una mayor biohidrogenización en estos animales, lo cual ha sido también confirmado por otros autores (Demirel *et al.*, 2006). Es probable que esto se deba a la concentración más baja de carbohidratos comparado a las dietas de concentrados, donde el alto contenido de carbohidratos reduce el tiempo de residencia del alimento en el rumen,

disminuyendo de esta forma la biohidrogenización de los ácidos grasos (Petrova *et al.*, 1994). En la mayoría de los estudios primarios considerados para meta-análisis, el mayor contenido de ácidos grasos saturados fue generalmente debido a los altos niveles de C14:0 y C16:0, pocos estudios reportaron un incremento en C18:0. En general, los ácidos grasos saturados tienen un efecto potente y de dosis-respuesta sobre el colesterol total y los LDL. Por otro lado, cada uno de los ácidos grasos tiene un efecto diferente: C12:0-16:0 tienen un efecto hipercolesterolemico mientras C18:0 tiene un efecto neutral. En este sentido, es necesario investigar los factores reguladores que podrían oponerse al incremento de estos ácidos grasos hipercolesterolemicos.

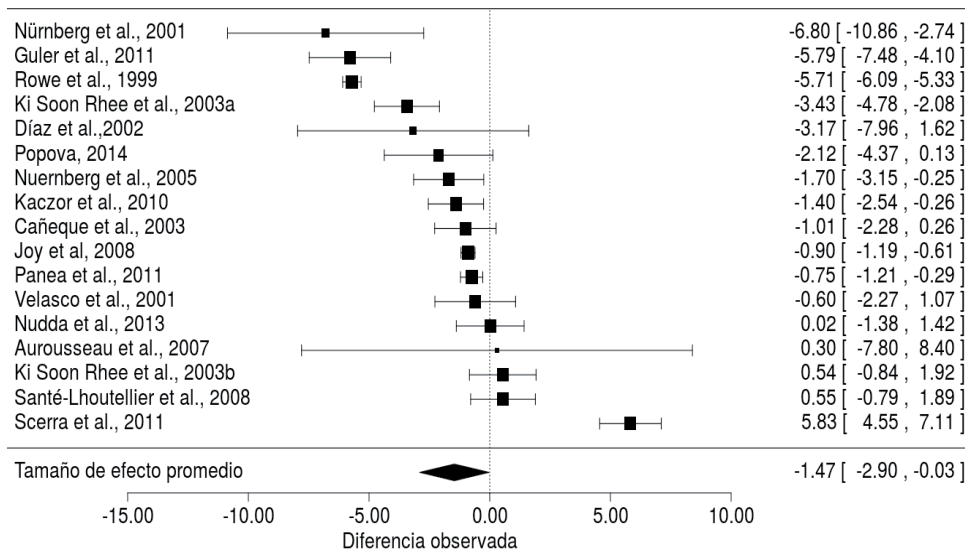


Figura 1. Gráfico de 'forest-plot' del efecto del tipo de crianza (pastoreo versus intensiva) sobre el tenor de ácidos grasos saturados en la carne de cordero. El gráfico muestra los tamaños de efecto e intervalo de confianza al 95% para cada estudio.

Aunque no es concluyente debido a la gran variabilidad entre estudios primarios, los resultados de este meta-análisis señalan que los corderos sujetos al pastoreo presentan niveles de saturación más altos en la fracción lipídica intramuscular, lo cual podría implicar cierto efecto negativo de la crianza extensiva para una dieta humana saludable.

REFERENCIAS

- Aourousseau, B., Bauchart, D., Faure, X., Galot, A.C., Prache, S., Micol, D. & Priolo, A. 2007. Meat Sci. 76 :241-252.
- Bas, P. & Morand-Fehr, P. 2000. Livest. Prod. Sci. 64: 61-79.
- Cañeque, V., Velasco, S., Díaz, M.T., Huidobro, F.R., Pérez, C. & Lauzurica, S. 2003. Anim. Res. 52: 271–285.
- Cividini, A., Levart, A., Žgur, S. & Kompan, D., 2014. Meat Sci. 97:480-485.
- Demirel, G., Ozpinar, H., Nazli, B. & Keser, O. 2006. Meat Sci. 72: 229-235.
- Díaz, M.T., Velasco, S., Cañeque, V., Lauzurica, S., Huidobro, F.R., Pérez, C., Gonzales, J. & Manzanares, C. 2002. Small Rum. Res. 43: 257-268.
- Fernandez-Duque, E. 1997. Oikos 79:616–618.
- Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H. & Renerre, M. 2005. Meat Sci. 69: 175-186.
- Guler, G.O., Atkumsek, A. & Karabacak, A. 2011. Kafkas Univ. Vet.Fak.Derg. 17: 885-892.

- Joy, M., Ripoll, G. & Delfa, R. 2008. *Small Rum. Res.* 78: 123-133.
- Kaczor, U., Borys, B. & Pustkowiak, H. 2010. *Czech J. Anim. Sci.* 55: 408–419.
- Ki Soon Rhee, Lupton, C.J., Ziprin, Y.A. & Rhee, K.C. 2003a. *Meat Sci.* 67: 693-699.
- Ki Soon Rhee, Lupton, C.J., Ziprin, Y.A. & Rhee, K.C. 2003b. *Meat Sci.* 65:701–706.
- Majdoub, L., Vermorel, M. & Ortigues-Marty, I. 2001. *Proceedings of the French–Polish Symposium, Paris, France, 25–26 September, C24*, p. 51.
- Nudda, A., Battacone, G., Boe, R., Manca, M. G., Pier, S., Rassa, G. & Pulina, G. 2013. *It. J. Anim. Sci.* 12 : 459-467.
- Nuernberg, K., Nuernberg, G., Ender, K., Dannenberger, D., Schnabel., W., Grumbach, S., Zupp, W. & Steinhart, H. 2005. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 737–745
- Nürnberg, K., Grumbach, S., Nürnberg, G., Hartung, M., Zupp, W. & Ender, K. 2001. *Arch. Tierz.* 44: 351-360.
- Panea, B., Carrasco, S., Ripoll, G. & Joy, M. 2011. *Sp. J. Agric. Res.* 9: 74-85.
- Petrova, Y., Banskalieva, V. & Dimov, V. 1994. *Small Rum. Res.*, 13: 263–267.
- Popova, T. 2014. *Emir. J. Food Agric.* 26: 302-308.
- Rowe, A., Macedo, F. A. F., Visentainer, J. V., Souza, N. E. & Matsushita, M. 1999. *Meat Sci.* 51: 283–288.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E. & Gatellier, P. 2008. *Food Chem.* 109: 573-579.
- Scerra, M., Luciano, G., Caparra, P., Foti, F., Ciliono, C., Giorgi, A. & Scerra, V. 2011. *Meat Sci.* 89: 238-242.
- Velasco, S., Cañeque, V., Perez, C., Lauzurica, S., Diaz, M.T., Huidobro, F., Manzanares, C. & Gonzalez, C., 2001. *Meat Sci.* 59: 325-333.
- 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:

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo financiero del programa Erasmus+ de la Unión Europea.

EFFECT OF PASTURE VERSUS INDOORS REARING ON THE SATURATED FATTY ACIDS IN LAMB MEAT: META-ANALYSIS

ABSTRACT: The aim of this study was to measure the effect of pasture vs. indoors rearing on the content of the saturated fatty acids in lamb meat, using meta-analysis. A total of seventeen studies concerning the effect of access to pasture in lamb rearing systems on this quality trait were selected. Based on the high heterogeneity between studies, a random-effects model for assessing the data was applied. The kind of pasture (pure vs. supplemented) was considered as covariate. The model indicated that pasture rearing increased ($P < 0.05$) the total amount of the saturated fatty acids in lamb meat. Lambs grazing pure pasture displayed increased ($P < 0.01$) saturation of the intramuscular lipids, when compared to the animals receiving supplements such as concentrates or milk. Concerning the examined trait, the results of this study suggest certain negative effect of pasture rearing on the healthy quality of lamb meat.

Key words: lamb meat, saturated fatty acids, pasture

ESTUDIO DE META-ANÁLISIS DEL EFECTO DE ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EN LA FUERZA DE CORTE DE LA CARNE DE VACUNO

Xavier, C., Gonzales-Barron, U., Muller, A. y Cadavez*, V.A.P.
Centro de Investigaçã de Montanha (CIMO), ESA – Instituto Politécnico de Bragança.
Campus de Santa Apolónia, Braganza. Portugal. *vcadavez@ipb.pt

INTRODUCCIÓN

La ternereza de la carne de vacuno es el principal atributo de calidad (Hopkins y Fogarty, 1998) y su variación resulta en pérdidas de valor al ser rechazada por los consumidores. Este atributo puede ser evaluado objetivamente por la fuerza de corte, simulando la acción de la masticación, y se determina generalmente por el método de Warner-Bratzler (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Así, la fuerza de corte requerida para cortar una muestra de carne es inversamente proporcional a la ternereza de la carne.

La estimulación eléctrica (EE) se basa en el envío de una corriente eléctrica a la canal, la cual acelera el rigor mortis. La utilización de la EE previene el endurecimiento por el frío, porque induce el uso de ATPs antes del inicio del *rigor mortis*, acelera la glicólisis anaeróbica e incrementa la caída del pH. Así, la carne sometida a la EE es más tierna como resultado de la menor contracción del músculo en el *rigor mortis*. Diversos autores (Aalhus *et al.*, 1994; Strydom y Frylinck, 2014; Strydom *et al.*, 2005; Hwang y Thompson, 2001; Kim *et al.*, 2007; Kuttinarayanan y Ramanathan, 2010; White *et al.*, 2006; Hopes-Jones *et al.*, 2010) estudiaron el efecto de la EE en la ternereza de la carne de vacuno; sin embargo, ningún trabajo hasta el momento resumió los resultados obtenidos con este método. El meta-análisis es una metodología estadística que permite comparar los resultados obtenidos por diversos estudios sobre un determinado tema (Viechtbauer, 2010), y permite combinar los resultados de varios trabajos independientes y reconocer patrones en los resultados de estos trabajos (Gonzales-Barron *et al.*, 2012). Este trabajo tuvo como objetivo efectuar un estudio de meta-análisis sobre el efecto de la EE en la ternereza de la carne de vacuno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio de meta-análisis fue realizado usando el paquete *metafor* (Viechtbauer, 2010) del software R (R Development Core Team, 2011). Para esto, se utilizaron 8 artículos con información relativa a la media y errores estándar de la fuerza de corte de la carne obtenida de canales no estimuladas (Control) y estimuladas eléctricamente (Tratamiento). De este modo, el estudio se basa en la comparación de la diferencia media de la ternereza del músculo *Longissimus dorsi* y *Longissimus lumborum*, de la carne de vacuno sometidas o no a la EE. El tamaño del efecto promedio total fue determinado usando modelos meta-analíticos de efectos aleatorios y los resultados se visualizaron a través de un “forest plot”. La existencia de heterogeneidad entre los estudios publicados fue evaluada por el índice I^2 , definida como la proporción de la variación total que es atribuible a la variación entre estudios (Higgins y Thompson, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio meta-analítico, se definió un tamaño de efecto como la diferencia media entre la ternereza promedio de la carne de canales estimuladas (tratamiento) y la ternereza promedio de aquellas no estimuladas (Control). Así, un tamaño de efecto negativo indica que las carnes de las canales estimuladas eléctricamente presentan valores de fuerza de corte más bajos, mientras que un valor positivo indica lo contrario. Aunque el modelo de efectos aleatorios indica la presencia de heterogeneidad ($I^2=83.4\%$) entre estudios, se puede concluir que la EE contribuye a aumentar ($P<0.001$) la ternereza de la carne de vacuno con un tamaño de efecto estimado de -1.34 kgf. El “forest plot” (Figura 1) muestra también que los estudios presentan diferente precisión (intervalo de confianza diferentes) y que el estudio de Strydom *et al.* (2005) presentó una mayor contribución para el tamaño de efecto promedio, como se observa por la mayor dimensión del cuadrado. Por otro lado, el trabajo de White *et al.* (2006) presentó el mayor tamaño del efecto (-3.15 kgf), aunque exhibió también la mayor variación (CI: -7.37 a 1.07).

La EE contribuye a un aumento global de la terneza de la carne de vacuno, ya que estimula directamente el músculo después de la muerte del animal, provocando la aceleración del proceso de *rigor mortis*, y la caída inmediata del pH (Lombard, 2009). La EE contribuye para que el *rigor mortis* ocurra a una temperatura elevada y evita la ocurrencia del endurecimiento por frío en el músculo. Asimismo, también acelera el proceso de maduración de la carne (Simmons *et al.*, 2008). En resumen, la EE mejora las características de calidad (color, terneza, etc.) de la carne de vacuno y puede ser utilizada para reducir las variaciones en los atributos de calidad de la carne, resultante de los efectos ambientales tales como edad, nutrición y estrés del animal (Lombard, 2009).

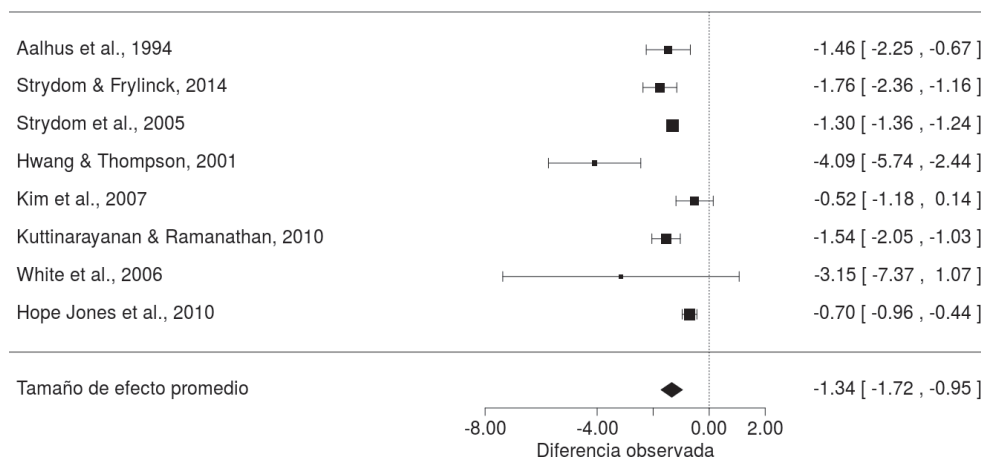


Figura 1. Gráfico de “forest plot” del efecto de la estimulación eléctrica sobre la fuerza de corte de carne de vacuno. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza al 95%.

El tamaño del efecto desplegó una gran variación entre estudios; variación esperada pues resulta de las diferentes condiciones experimentales de los mismos. Sin embargo, aplicando un modelo de tipo aleatorio, dicha variabilidad entre estudios fue extraída, y el tamaño del efecto promedio final confirmó el efecto positivo de la estimulación eléctrica en la terneza de la carne de vacuno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- W. Viechtbauer, Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package, *J. Stat. Softw.* 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.
- D.L. Hopkins y N.M. Fogarty, Diverse lamb genotypes–2. Meat pH, colour and tenderness, *Meat Sci.* 49 (1998) 477–488.
- E. Huff-Lonergan y S.M. Lonergan, Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of post mortem biochemical and structural changes, *Meat Sci.* 71 (2005) 194–204.
- J.P.T. Higgins y S.G. Thompson, Quantifying heterogeneity in a metaanalysis, *Statistics in Medicine* 21 (11) (2002) 1539–1558, ISSN 1097-0258, doi: 10.1002/sim.1186, URL <http://dx.doi.org/10.1002/sim.1186>.

- A.C. Lombard, The effect of electrical inputs during beef processing on resultant meat quality, Master Thesis, Faculty of Agricultural Science, Stellenbosch University, South Africa (2009).
- J.L. Aalhus, S.D.M. Jones, S. Lutz, D.R. Best y W.M. Robertson, The efficacy of high and low voltage electrical stimulation under different chilling regimes, *Can. J. Anim. Sci.* (1994) 433–442.
- Y.S. Kim, C.N. Lee, W. DuPont y G.K. Fukumoto, Improving Tenderness of Forage-Finished Beef Using a Low-Voltage Electrical Stimulator, *Food Safety Technol.* (2007) 1–6.
- P. Kuttinarayanan y R. Ramanathan, Effects of low-dose irradiation and electrical stimulation on quality parameters of beef longissimus from *Bos indicus* x *Bos Taurus* bulls, *Int. J. Food Sci. Technol.* 45 (2010) 1009–1015.
- P.E. Strydom, L. Frylinck y M.F. Smith, Should electrical stimulation be applied when cold shortening is not a risk? *Meat Sci.* 70 (2005) 733–742.
- I.H. Hwang y J.M. Thompson, The effect of time and type of electrical stimulation on the calpain system and meat tenderness in beef *longissimus dorsi* muscle, *Meat Sci.* 58 (2001) 135–144.
- M. Hope-Jones, P.E. Strydom, L. Frylinck y E.C. Webb, The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β -agonists on meat tenderness of feedlot cattle, *Meat Sci.* 86 (2010) 699–705.
- P.E. Strydom y L. Frylinck, Minimal electrical stimulation is effective in low stressed and well fed cattle, *Meat Science* 96 (2014) 790–798.
- A. White, A. O’Sullivan, D.J. Troy y E.E. O’Neil, Effects of electrical stimulation, chilling temperature and hot-boning on the tenderness of bovine muscles, *Meat Sci.* 73 (2006) 196–203.

Agradecimientos: Esta investigación se realizó dentro del proyecto PTDC/AGR-TEC/3107/2012, financiado por la Fundación Portuguesa de Ciencia y Tecnología (FCT)/Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER). La Dra. Gonzales-Barron agradece el apoyo financiero provisto por la FCT a través del programa ‘Investigator Fellowship’ (IF/00570).

META-ANALYSIS STUDY OF THE ELECTRICAL STIMULATION EFFECT ON BEEF MEAT TENDERNESS

ABSTRACT: The objective of this work was to use meta-analysis to estimate the effect size of the electrical stimulation on beef tenderness through the study of the measurements of shear force. Eight independent studies were used based on comparison of shear force measurements on the *Longissimus dorsi* and *Longissimus lumborum* in cattle carcasses subject to electrical stimulation and unstimulated carcasses. For each study, the mean effect size and standard error was calculated in order to apply a random-effects meta-analysis model. The meta-analysis demonstrated that the electrical stimulation on beef carcasses decreases the values of shear-force of meat by an average of 1.34 kgf. Thus, this study confirmed the positive effect of the electrical stimulation on the beef meat tenderness. However, the effect size displayed high variation among studies which can be attributed to differences in their experimental conditions.

Keywords: beef meat, shear force, electrical stimulation, meta-analysis.

UTILIDAD DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES MEDIDOS A LOS TRES DÍAS POST MORTEM PARA PREDECIR LA CALIDAD SENSORIAL DE LA CARNE DE LA INDICACIÓN GEOGRÁFICA PROTEGIDA “CARNE DE LA SIERRA DEL GUADARRAMA” AL SEXTO DÍA DE MADURACIÓN

Miguel¹, E., Onega¹, E. y Ruiz de Huidobro^{1,2} F.

¹Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Carretera A-2, Km 38,200. Apartado 127. 28800 Alcalá de Henares.

²Dirección actual: Laboratorio Regional de Sanidad Animal. Comunidad de Madrid. Carretera M-625, Km 1,800. 28770 Colmenar Viejo.

*eugenio.miguel@madrid.org

INTRODUCCIÓN

Se ha estudiado la utilidad de diferentes variables instrumentales medidas al tercer día de maduración para predecir la calidad sensorial de la carne madurada durante 6 días. Junto a estas variables se han incluido en el modelo tres variables zootécnicas (peso de la canal caliente y puntuaciones de acuerdo con las escalas de estimación subjetiva del estado de engrasamiento y la conformación de la canal del Modelo Europeo de Clasificación de Canales de vacuno) medidas en el matadero el mismo día del sacrificio de los animales. Se ha comparado la utilidad de las variables instrumentales medidas al tercer día con la de las mismas variables ensayadas a las 24 horas post-mortem y que se discutían en la otra comunicación anterior.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han empleado animales cruzados de madre Avileña y padre Limusino, Charolés o Pardo Alpino, de la I.G.P. "Sierra de Guadarrama". Se utilizaron los lomos de 9 terneras y 8 añejos, seccionados paralelamente al plano sagital, estudiando dos tiempos de maduración: 3 y 6 días. Las muestras destinadas a sucesivas maduraciones se mantuvieron entre 0 y 4 °C sin vacío. La CRA, humedad y PPC se ensayaron en fresco, mientras que las muestras para el análisis de textura y sensorial se envasaron a vacío, se congelaron y se mantuvieron a -40 °C hasta el momento del análisis. El pH se midió, con un pHmetro Crisson con electrodo de penetración, a los 45 minutos, 24 y 48 horas y a los 3 y 6 días *post mortem*. El color se midió mediante un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-200, utilizando el espacio de color CIELAB (CIE, 1976). La CRA, PPC, la texturometría con sonda de Warner-Bratzler y el análisis sensorial se realizaron según Onega y cols. (2000), aumentando la temperatura de cocinado hasta 80°C, y ampliando el análisis sensorial a los parámetros de sensación grasa, intensidad del flavor y número de masticaciones. También se realizó texturometría mediante un test de perfil de textura (TPA), obteniendo los valores de dureza, elasticidad y masticabilidad. La humedad se determinó siguiendo el método basado en la norma ISO/R 1442 y el método de análisis de productos cárnicos (BOE, 29/08/79). El análisis estadístico se realizó mediante el programa Estadística para Windows, versión 5.0, realizando un análisis de regresión múltiple (stepwise) seleccionando las variables sensoriales como variables dependientes y las variables instrumentales como variables independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de grasa intramuscular es la primera variable seleccionada en el análisis de regresión múltiple para la predicción de la dureza sensorial al sexto día (Tabla 1). La segunda variable es el pH a las 72 horas. Mediante estas dos variables se puede explicar más del 50% de la varianza observada. Las siguientes variables incluidas en el modelo son la dureza TPA en carne cocinada, la tonalidad y la elasticidad TPA en carne cocinada.

Para la elasticidad la primera variable seleccionada es la dureza TPA en carne cruda. La segunda variable es el PPC. Las siguientes variables son la dureza TPA en carne cocinada, la tonalidad y la dureza Warner-Bratzler en carne cruda. Mediante estas cinco variables es posible explicar el 62% de la varianza observada.

El PPC es la mejor variable para la predicción de la jugosidad sensorial al sexto día, mientras que el contenido de colágeno total de la carne es la segunda. Las siguientes variables son la tonalidad, la elasticidad TPA en carne cocinada y la humedad. Mediante las tres primeras variables se puede explicar el 85% de la varianza observada.

El índice de amarillo es la variable instrumental medida al tercer día que resulta más útil para la predicción de la sensación grasa al sexto. La segunda variable es el PPC. Mediante estas dos variables es posible explicar el 76% de la varianza. Las siguientes variables son la elasticidad TPA en carne cruda, la CRA y el contenido de colágeno soluble.

El PCC es la mejor variable para la predicción del agrado al sexto día. La segunda es la CRA. Sólo una tercera variable es seleccionada: el índice de rojo. Mediante estas tres variables se puede explicar el 63% de la varianza observada en el agrado al sexto día.

Para la predicción del flavor la mejor variable es PPC. Las siguientes variables seleccionadas son el PCC, el contenido de grasa intramuscular, el pH a las 72 horas *post mortem* y la escala de estimación subjetiva del estado de engrasamiento de la canal. Mediante estas cinco variables se alcanza a explicar un 95% de la varianza observada.

La CRA y el contenido de grasa intramuscular son las dos mejores variables para la predicción del número de masticaciones. Las siguientes variables son la escala de estimación subjetiva del estado de engrasamiento, la elasticidad TPA en carne cruda y la masticabilidad TPA en carne cruda. Mediante estas cinco variables se puede explicar un 66% de la varianza observada.

Las variables zootécnicas son útiles para la predicción de la calidad sensorial de la carne al sexto día de maduración. La escala subjetiva de estimación de la conformación es la tercera variable seleccionada para la predicción del número de masticaciones, el PCC es la mejor para la predicción del agrado y la segunda para el flavor, mientras que la escala de estimación subjetiva del estado de engrasamiento es útil para la predicción del flavor.

El pH a las 72 horas es útil para la predicción de la dureza y el flavor al sexto día, mientras que el contenido de grasa intramuscular es la variable más útil para la predicción de la dureza, la segunda para el número de masticaciones y la tercera para el flavor.

Las variables relacionadas con el contenido acuoso de la carne y las medidas al tercer día son muy útiles para la predicción de la calidad sensorial de la carne al sexto día. Así, la CRA es la mejor variable para la predicción del número de masticaciones, la segunda para el agrado y la cuarta para la sensación grasa. La humedad es útil para la jugosidad. El PPC es la mejor variable para la predicción de la jugosidad y el flavor, y la segunda para la elasticidad y la sensación grasa.

Las variables relacionadas con el contenido de colágeno medidas al tercer día también son útiles para la predicción de la calidad sensorial de la carne al sexto. El contenido de colágeno total es la segunda variable para la predicción de la jugosidad. El contenido de colágeno soluble es útil para la predicción de la sensación grasa.

En el caso del color, el índice de rojo es útil para predecir el agrado, el índice de amarillo es la mejor variable para la predicción de la sensación grasa, mientras que la tonalidad es útil para predecir la jugosidad, la dureza y la elasticidad.

Observando la utilidad de las variables de textura instrumental en carne cruda se puede apreciar que la dureza Warner-Bratzler es útil para predecir la elasticidad, la dureza TPA es la mejor variable para la elasticidad, la elasticidad TPA es útil para predecir la sensación grasa y el número de masticaciones. La utilidad de las variables de textura instrumental en carne cocinada medidas al tercer día de maduración para la predicción de la calidad sensorial al sexto es baja. La dureza TPA es la tercera variable seleccionada para la predicción de la dureza y la elasticidad, mientras que la elasticidad TPA es seleccionada en cuarto lugar para la predicción de la jugosidad y en quinto lugar para la dureza. Estos resultados son diferentes a los obtenidos cuando se predice la calidad sensorial de la carne al sexto día a partir de variables instrumentales medidas el primer día.

Sólo la jugosidad mejora su predicción cuando la medida se realiza al tercer día en vez de a las 24 horas *post mortem*. En la comunicación que acompaña a esta se mostraba que se podía explicar un 74 % de la varianza observada incluyendo en el modelo la elasticidad TPA en carne cocinada, la dureza WB en carne cocinada, el pH a las 24 horas, el contenido de grasa intramuscular y la masticabilidad TPA en carne cocinada. Midiendo las variables al tercer día se puede alcanzar un 91 % de la varianza observada. Sin embargo al medir las variables instrumentales al tercer día se obtiene predicciones claramente peores para el agrado, la dureza, y el número de masticaciones. Para el resto de variables sensoriales es indiferente realizar la medida al primero o al tercer día.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B.O.E. 1979. Boletín Oficial del Estado (29-08-1979), pp. 2595-2603. • C.I.E. 1976. 18^o session, 1975. Publication CIE n^o 36. Paris: Centre international de l'éclairage. • I.S.O. 1973. Rule ISO/R1442. International Organisation for Standardisation. • Onega, E., Ruiz de Huidobro, F. et al., 2000. XXV Jornadas Científicas de la SEOC. In I. Sierra, F. Guillén, I. Garitano: Producción Ovina y Caprina N^o XXV. Ed. SEOC, pp. 135-138.

Tabla 1. Predicción de la calidad sensorial al sexto día de maduración por las variables zootécnicas e instrumentales al tercer día.

Dureza		Elasticidad		Jugosidad		Sensación grasa	
Variable	R ²	Variable	R ²	Variable	R ²	Variable	R ²
Grasa int	0,32	DurTPAcr	0,24	PPC	0,36	b*	0,59
pH72	0,53	PPC	0,31	ColagTot	0,64	PPC	0,76
DurTPAco	0,57	DurTPAco	0,38	H*	0,85	EITPAcr	0,82
H*	0,62	H*	0,52	EITPAco	0,89	CRA	0,87
EITPAco	0,67	WBcr	0,62	Humedad	0,91	ColagSol	0,90

Apreciación		Flavor		Número Masticac	
Variable	R ²	Variable	R ²	Variable	R ²
PCC	0,41	PPC	0,23	CRA	0,29
CRA	0,50	PCC	0,43	Grasa int	0,47
a*	0,63	Grasa int	0,71	Conf	0,55
		pH72	0,82	EITPAcr	0,60
		Engr	0,93	MasTPAcr	0,66

MasTPAcr: Masticabilidad TPA en carne cruda; EITPAcr: Elasticidad TPA en carne cruda; DurTPAcr: Dureza TPA en carne cruda; DurTPAco: Dureza TPA en carne cocinada; EITPAco: Elasticidad TPA en carne cocinada; WBcr: Dureza Warner-Bratzler en carne cruda; WBco: Dureza Warner-Bratzler en carne cocinada; Grasa int: Contenido en grasa intramuscular; CRA: Capacidad de retención de agua; PPC: Pérdidas por cocción; pH72: pH de la carne medido a los 3 días; H: tonalidad; L*: Luminosidad; a*: índice de rojo; b* índice de amarillo; ColagTot: Contenido de colágeno total; ColagSol: Contenido de colágeno soluble; Conf: Puntuación de la conformación (método UE); Engr: Puntuación del estado de engrasamiento (método UE); PCC: Peso de la canal caliente.*

INSTRUMENTAL VARIATES RECORDED AT FIRST DAY OF AGEING ARE USEFUL FOR THE PREDICTION OF MEAT SENSORY CHARACTERISTICS OF P.G.I "CARNE DE LA SIERRA DE GUADARRAMA" AGED SIX DAYS

ABSTRACT: Establishing an optimal time for aged meat consumption would be a useful tool for consumer information. It is therefore important to predict sensory quality of aged meat before the ageing process. When instrumental variates are measured at 3 days of ageing, the worst predictions are obtained for hardness, number of chewings and, specially, pleasantness assessed at six days. Juiciness is better predicted by instrumental variates at 3 days of ageing. Instrumental and zootechnical variables measured at 24 hours *post mortem* are more useful to predict sensory meat quality at the sixth day of ageing in samples of P.G.I. "Carne de la Sierra del Guadarrama" than by those measured at 3 days of ageing.

Keywords: meat, texture; sensory analysis;

UTILIDAD DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES MEDIDOS A LAS 24 HORAS POST MORTEM PARA PREDECIR LA CALIDAD SENSORIAL DE LA CARNE DE LA INDICACIÓN GEOGRÁFICA PROTEGIDA “CARNE DE LA SIERRA DEL GUADARRAMA” AL SEXTO DÍA DE MADURACIÓN

Miguel¹, E., Onega¹, E. y Ruiz de Huidobro^{1a} F.

¹Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Carretera A-2, Km 38,200. Apartado 127. 28800 Alcalá de Henares.

^aDirección actual: Laboratorio Regional de Sanidad Animal. Comunidad de Madrid. Carretera M-625, Km 1,800. 28770 Colmenar Viejo.

*eugenio.miguel@madrid.org

INTRODUCCIÓN

La maduración induce cambios que mejoran la calidad sensorial de la carne. El establecimiento de un tiempo de consumo preferente para la carne sometida a procesos de maduración sería un instrumento útil para la información del consumidor. Para ello es importante poder predecir la calidad sensorial de la carne madurada desde el inicio del proceso de maduración. Este estudio se ha realizado en ternera y añojo (los tipos comerciales más consumidos en España) en dos tiempos de maduración (1 y 6 días). Se han medido variables instrumentales a lo largo del proceso de maduración para tratar de predecir la calidad sensorial de la carne al sexto día. Las variables independientes que se han utilizado son las puntuaciones para el estado de engrasamiento y la conformación (Modelo Europeo de Clasificación de Canales de vacuno), el peso de la canal caliente (PCC), las medidas del pH (a los 45 minutos, 24 horas, y a los 3 y 6 días de maduración), el contenido de grasa intramuscular, los contenidos de colágeno total, soluble e insoluble, la capacidad de retención de agua (CRA), las pérdidas por cocción (PPC) y el contenido de humedad de la carne, los parámetros colorimétricos y las medidas de textura instrumental en carne cruda y cocinada: (ensayo de Warner-Bratzler (WB) y perfil de textura (TPA)).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han empleado animales cruzados de madre Avileña y padre Limusino, Charolés o Pardo Alpino, de la I.G.P. "Sierra de Guadarrama". Se utilizaron los lomos de 9 terneras y 8 añojos, seccionados paralelamente al plano sagital, estudiando dos tiempos de maduración: 1 día y 6 días. Las muestras destinadas a sucesivas maduraciones se mantuvieron entre 0 y 4 °C sin vacío. La CRA, humedad y PPC se ensayaron en fresco, mientras que las muestras para el análisis de textura y sensorial se envasaron a vacío, se congelaron y se mantuvieron a -40 °C hasta el momento del análisis. El pH se midió, con un pHmetro Crisson con electrodo de penetración, a los 45 minutos, 24 y 48 horas y a los 6 días *post mortem*. El color se midió mediante un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-200, utilizando el espacio de color CIELAB (CIE, 1976). La CRA, PPC, la texturometría con sonda de Warner-Bratzler y el análisis sensorial se realizaron según Onega y cols. (2000), aumentando la temperatura de cocinado hasta 80°C, y ampliando el análisis sensorial a los parámetros de sensación grasa, intensidad del flavor y número de masticaciones. También se realizó texturometría mediante un test del perfil de textura (TPA), obteniendo los valores de dureza, elasticidad y masticabilidad. La humedad se determinó siguiendo el método basado en la norma ISO/R 1442 y el método de análisis de productos cárnicos (BOE, 29/08/79). El análisis estadístico se realizó mediante el programa Statistica para Windows, versión 5.0, realizando un análisis de regresión múltiple (*stepwise*), seleccionando las variables sensoriales como variables dependientes, y las variables instrumentales como variables independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables zootécnicas e instrumentales medidas a las 24 horas son útiles para predecir la calidad sensorial de la carne al sexto día. La masticabilidad TPA en carne cruda, medida al primer día de maduración, es la primera variable seleccionada para la predicción de la dureza (37% de la varianza observada). Las siguientes variables que se seleccionaron fueron el contenido de grasa intramuscular, la tonalidad, la humedad y el contenido de colágeno total de la carne. Estas cinco variables predicen el 88% de la varianza observada. La CRA es la variable más útil para predecir la elasticidad. Las siguientes variables fueron la humedad, el PCC, la escala de estimación subjetiva de la conformación y la masticabilidad

TPA en carne cruda. Estas variables explican el 59% de la varianza. La elasticidad es la variable sensorial que se predice peor por medio de las variables instrumentales.

La elasticidad TPA en carne cocinada es la primera variable seleccionada para la predicción de la jugosidad (33% de la varianza observada). La segunda variable es la dureza WB en carne cocinada. Las siguientes variables fueron el pH a las 24 horas, el contenido de grasa intramuscular y la masticabilidad TPA en carne cocinada. Mediante estas cinco variables es posible explicar el 74% de la varianza observada.

La masticabilidad TPA en carne cruda es la primera variable seleccionada para la predicción de la sensación grasa. Con esta única variable se puede explicar el 50% de la varianza observada. Las siguientes variables son las PPC, la luminosidad, la dureza WB en carne cocinada y el contenido de colágeno soluble. Mediante estas cinco variables se puede llegar a explicar el 95% de la varianza observada. La sensación grasa y el flavor son las variables sensoriales que se predicen mejor.

El PCC es la mejor variable para la predicción del agrado. Las siguientes variables son el índice de amarillo de la carne, la evaluación subjetiva del estado de engrasamiento de la canal, la elasticidad TPA en carne cruda, y el pH a los 45 minutos *post mortem*. Un 87% de la varianza observada puede explicarse mediante estas variables.

La primera variable seleccionada para la predicción del flavor al es el contenido de colágeno insoluble. La segunda es la escala de estimación subjetiva del estado de engrasamiento de la canal. Mediante estas dos primeras variables es posible explicar el 50% de la varianza observada. Las siguientes variables útiles para la predicción del flavor son la dureza TPA en carne cruda, PCC y la elasticidad TPA en carne cruda. Mediante estas cinco variables es posible explicar el 95% de la varianza observada.

El contenido de grasa intramuscular es la primera variable seleccionada para la predicción del número de masticaciones. La segunda variable es la escala de estimación subjetiva del estado de engrasamiento de la canal. Mediante estas dos variables es posible explicar el 50% de la variación observada. Las siguientes variables introducidas en el modelo fueron la elasticidad TPA en carne cruda, la tonalidad de la carne y el contenido de colágeno soluble.

Las variables zootécnicas son muy útiles para la predicción de la calidad sensorial de la carne al sexto día de maduración. El PCC es la primera variable seleccionada para la predicción del agrado, la tercera para la elasticidad y la cuarta para el flavor. La escala de estimación subjetiva del estado de engrasamiento es la segunda variable para la predicción del agrado y del número de masticaciones, y la tercera para el agrado. La escala de estimación subjetiva de la conformación de la canal es la cuarta variable seleccionada para la predicción de la elasticidad y la séptima para la predicción de la dureza y el flavor.

El pH a los 45 minutos es muy útil para la predicción del agrado y el pH a las 24 horas *post-mortem* para la predicción de la jugosidad.

En relación con las variables relacionadas con la composición química de la carne, la CRA es la primera variable seleccionada para la predicción de la elasticidad. La humedad es útil para la predicción de la dureza y la elasticidad y el PPC para la sensación grasa. El contenido de grasa intramuscular es la primera variable para la predicción del número de masticaciones, la segunda para la dureza y la cuarta para la jugosidad. El contenido de colágeno insoluble es la mejor variable instrumental para la predicción del flavor. El contenido de colágeno soluble también es útil para la predicción de la sensación grasa y del número de masticaciones, mientras que el contenido de colágeno total es útil para la predicción de la dureza.

En relación con el color, la luminosidad es útil para la predicción de la sensación grasa, el índice de amarillo es la segunda variable seleccionada para la predicción del agrado y la tonalidad es especialmente útil para la predicción de la dureza y el número de masticaciones.

Entre las variables instrumentales de textura en carne cruda la dureza TPA es muy útil para la predicción del número de masticaciones; la elasticidad TPA es útil para predecir el número de masticaciones, el agrado y el flavor; y la masticabilidad TPA es la primera variable seleccionada para la predicción de la dureza y sensación grasa y la quinta para la predicción de la elasticidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B.O.E. 1979. Boletín Oficial del Estado (29-08-1979), pp. 2595-2603. • C.I.E. 1976. 18^o session, 1975. Publication CIE n^o 36. Paris: Centre international de l'éclairage. • I.S.O. 1973. Rule ISO/R1442. International Organization for Standardization. • Onega, E., Ruiz de Huidobro, F. et al., 2000. XXV Jornadas Científicas de la SEOC. In I. Sierra, F. Guillén, I. Garitano: Producción Ovina y Caprina N^o XXV. Ed. SEOC, pp. 135-138.

Tabla 1. Predicción de la calidad sensorial al sexto día de maduración por las variables zootécnicas e instrumentales al primer día.

Dureza		Elasticidad		Jugosidad		Sensación grasa	
Variable	R ²	Variable	R ²	Variable	R ²	Variable	R ²
MasTPAcr	0,37	CRA	0,15	EITPAco	0,33	MasTPAcr	0,50
Grasa int	0,53	Humedad	0,23	WBco	0,45	PPC	0,65
H*	0,70	PCC	0,30	pH24	0,51	L*	0,75
Humedad	0,84	Conf	0,52	Grasa int	0,64	WBco	0,88
ColagTot	0,88	MasTPAcr	0,59	MasTPAcr	0,74	ColagSol	0,94

Apreciación		Flavor		Número Masticac	
Variable	R ²	Variable	R ²	Variable	R ²
PCC	0,41	ColagInsol	0,44	Grasa int	0,34
b*	0,58	Engr	0,59	Engr	0,50
Engr	0,70	DurTPAcr	0,72	EITPAcr	0,64
EITPAcr	0,81	PCC	0,87	H*	0,72
pH45	0,87	EITPAcr	0,93	ColagSol	0,77

MasTPAcr: Masticabilidad TPA en carne cruda; EITPAcr: Elasticidad TPA en carne cruda; DurTPAcr: Dureza TPA en carne cruda; EITPAco: Elasticidad TPA en carne cocinada; MasTPAco: Masticabilidad TPA en carne cocinada; WBco: Dureza Warner-Bratzler en carne cocinada; Grasa int: Contenido en grasa intramuscular; CRA: Capacidad de retención de agua; PPC: Pérdidas por cocción; pH24: pH de la carne medido a las 24 horas post mortem; pH45: pH de la carne medido a los 45 minutos del sacrificio; H: tonalidad; L*: Luminosidad; ColagTot: Contenido de colágeno total; MasTPAcr: Masticabilidad TPA en carne cruda; ColagSol: Contenido de colágeno soluble; ColagInsol: Contenido de colágeno insoluble; b*: índice de amarillo; Conf: Puntuación de la conformación (método UE); Engr: Puntuación del estado de engrasamiento (método UE); PCC: Peso de la canal caliente.*

INSTRUMENTAL VARIATES RECORDED AT FIRST DAY OF AGEING ARE USEFUL FOR THE PREDICTION OF MEAT SENSORY CHARACTERISTICS OF P.G.I "CARNE DE LA SIERRA DEL GUADARRAMA" AGED SIX DAYS

ABSTRACT: It is well known that ageing produces changes in meat characteristics. Establishing an optimal time for meat aged consumption would be a useful tool for consumer information. It is therefore important to predict meat sensory quality before meat ageing. Instrumental and zootechnical variables measured at 24 hours *post mortem* are useful for a good prediction of sensory meat quality at the sixth day of ageing in samples of P.G.I. "Carne de la Sierra del Guadarrama". The best predictions are obtained for greasiness and flavour. Good predictions are also obtained for hardness and pleasantness, the number of chewings and juiciness.

Keywords: meat, texture; sensory analysis

INFLUENCIA DEL MÚSCULO Y LAS TEMPERATURAS DE COCINADO Y ENFRIADO EN LA DUREZA INSTRUMENTAL DE LA CARNE

Ripoll, G., Panea, B y Albertí, P.

CITA. Avda. Montañana, 930. 50059. Zaragoza, España. gripoll@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La fuerza de cizalla medida con la célula de carga Warner-Bratzler es una de las técnicas más usadas para determinar la dureza de la carne cocinada. La temperatura de cocinado tiene un gran efecto en la dureza de la carne y en el rango entre 60°C y 80°C la dureza aumenta al hacerla a temperatura. En los ensayos de textura, el cocinado de la carne es detenido generalmente colocando las muestras en agua corriente fría o a temperatura ambiente, pero en la mayoría de los estudios no se aporta ninguna información sobre la temperatura del agua, tiempo de enfriado u otros detalles sobre el enfriado y cuando existe esta información, la metodología empleada es dispar. Así, algunos autores empiezan a cortar la carne cuando todavía está templada (Hwang *et al.*, 2004), 30°C), otros, cuando está a temperatura ambiente (21-23°C) (Johnson *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 1991; Tschirhart-Hoelscher *et al.*, 2006) y otros, alrededor de 2-4 °C (Belew *et al.*, 2003; Destefanis *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2002; Shackelford *et al.*, 2004; Swan *et al.*, 1998). Además de la temperatura de cocinado y enfriado, el valor de dureza, que se suele medir en el M. *Longissimus thoracis et lumborum*, puede diferir en función de la zona del lomo donde se mida, o si se mide en otros músculos también usados como el m. *Semitenidosus* y el m. *Psoas major*. Por estos motivos, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura de cocido y enfriado en la dureza instrumental de la carne de cabra de Angora medida con la célula Warner-Bratzler, así como estudiar las diferencias en dureza de tres músculos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se pesaron 20 cabras adultas de Angora (45,3 kg \pm 6,29 kg d.e.) y se sacrificaron sin ayuno, de acuerdo con las leyes europeas, en el matadero experimental del CITA. Una vez oreada la canal a 4 °C durante 24 horas, fue pesada (17,3 kg \pm 3,43 kg d.e.) y se calculó el rendimiento a la canal fría en porcentaje (37.96 % \pm 2.936 d.e.). De cada canal se extrajeron los músculos *Longissimus thoracis et lumborum* (LD) desde la 5ª vértebra torácica hasta la 6ª vértebra lumbar, el músculo *Semitenidosus* (ST) y el músculo *Psoas major* (PM). El m. *Longissimus thoracis et lumborum* se dividió en tres porciones de igual longitud, de manera que una fue el extremo craneal, otra el extremo caudal y la otra porción fue la central entre ambas. Así, de cada animal se obtuvieron 6 porciones de este músculo.

Todas las muestras se envasaron al vacío, se congelaron a -20 °C y se almacenaron a esa temperatura hasta el análisis. Las muestras se descongelaron durante 20 horas a 4 °C. Las muestras se cocinaron, siempre dentro de la bolsa de vacío, en un baño termostático Selecta Precisdig (J. P. Selecta, Barcelona, España) previamente precalentado hasta alcanzar una temperatura interna de 60, 70 u 80° C. La temperatura en el interior de la muestra se controló mediante termómetro Testo Datalogger 177-T4 con termopares tipo T. Las muestras se sacaron del baño termostático y se colocaron bajo agua fría corriente para detener la cocción, hasta alcanzar 30°C en el centro de la muestra. Después, unas muestras se mantuvieron en agua hasta que alcanzaron en el centro de la muestra 20 °C, y otras se mantuvieron en refrigeración hasta alcanzar 10°C, dependiendo del diseño experimental.

Después del enfriado se cortaron las muestras en forma de paralelepípedo con una sección de 10 x10 mm² con la dimensión mayor en dirección al mayor eje del músculo y de las fibras musculares (Honikel, 1998). Las muestras fueron cizalladas perpendicularmente al mayor eje de la submuestra con un Instron 5543, equipado con una célula Warner-Bratzler registrándose el Esfuerzo máximo (N/cm²).

El efecto del músculo se analizó mediante el Proc mixed de SAS donde se consideró el animal como unidad experimental y efecto aleatorio y el músculo como efecto fijo. Las diferencias entre medias mínimo cuadráticas se estudiaron por el ajuste de Tukey con un nivel de significación del 0,05. El peso de la canal fría se consideró como covariante, pero al no ser significativa, finalmente se excluyó del modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro ensayo se encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre músculos (Figura 1). Los músculos *Semitendinosus* (ST) y *Longissimus dorsi* (LD) tuvieron similar dureza ($P > 0,05$) y fue significativamente mayor que la del *Psoas major* (PM). La diferencia entre músculos de dureza Warner-Bratzler ya ha sido descrita anteriormente (Belew *et al.*, 2003) y se deben a diferencias en la proporción de fibras. En bovino parece bastante claro que el gradiente de dureza es $ST > LD > PM$ (Morgan *et al.*, 1991; Shackelford *et al.*, 1995; Shorthose y Harris, 1990), pero este patrón no es tan claro en otras especies. Así, por ejemplo, Kerth *et al.* (2003) no encontraron diferencias entre ST y LD en ovejas, mientras que Wheeler y Koochmaraie (1999), encontraron que el LD de cordero fue más duro que el PM.

En cuanto a las regiones estudiadas del m. *Longissimus dorsi*, se observó un incremento significativo de la dureza del músculo desde la zona craneal hacia la caudal ($P < 0,05$). La mayor diferencia de dureza estuvo entre la parte craneal y la parte central, con 20 N de diferencia aproximadamente (Figura 1). Shackelford *et al.* (2004) encontraron una tendencia similar en ovino, aunque cuando se estudiaron ovejas con el gen callypige la zona craneal fue más dura que la caudal. Cuando se estudiaron las diferencias entre la parte craneal y la caudal en bovino, Derington *et al.* (2011) encontraron que era más dura la parte caudal, sin embargo Torrescano *et al.* (2003) y Belew *et al.* (2003) no encontraron diferencias significativas.

Cuando se estudió la influencia de la temperatura de cocinado y enfriado en la textura, se encontró una interacción entre ambas ($P < 0,05$). Cuando la carne se cocinó a 60°C y a 80 °C, no hubo diferencias en dureza entre ellas, aunque se apreció una ligera tendencia a aumentar la dureza con la temperatura de cocinado. Tampoco se observó a estas temperaturas de cocinado diferencias entre temperaturas de enfriado. Sin embargo, cuando se cocinó la carne a 70 °C, la carne enfriada a 20 °C fue significativamente ($P < 0,05$) más dura que la enfriada a 10 °C. Además, la carne 70°C/10°C fue de dureza similar a la cocinada a 60°C y 80°C, y enfriada a cualquier temperatura, mientras que la carne 70°C/20°C fue significativamente distinta de la carne cocinada a 60°C. Christensen *et al.* (2000) encontraron que la carne de bovino aumenta su dureza de 60°C a 80°C. Bouton y Harris (1972) también encontraron este comportamiento aunque mucho menos acusado. Con estos resultados, se recomendaría cocinar a 80°C ya que es la temperatura con unos valores similares en intermedios a 60 °C y 70 °C, y que además no está influida por la temperatura de enfriado. Si se sigue la metodología estándar (70°C), la mejor opción es enfriar la carne a 10 °C puesto que ofrece valores comparables con las otras temperaturas de cocinado, y por tanto más estables frente a pequeñas diferencias en la temperatura de cocinado entre muestras o ensayos. La temperatura de enfriado es un factor importante que se debería fijar y controlar más en los ensayos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belew J.B. *et al.* 2003. Meat Sci., 64: 507-512
- Bouton y Harris, P. V. 1972. J. Food Sci, 37, 140-144
- Christensen M., *et al.* 2000. Meat Sci., 55: 301-307
- Derington AJ, *et al.* 2011. Meat Sci, 88: 203-208
- Destefanis G, *et al.* 2008. Meat Sci., 78: 153-156
- Honikel KO .1998. Meat Sci., 49: 447-457
- Hwang I. H., *et al.* 2004. Meat Sci, 68: 497-505
- Johnson DD, *et al.* 1995. Small Rum. Res., 17: 57-63
- Kannan G, *et al.* 2002. J. Anim. Sci., 80: 2383-2389
- Kerth CR, *et al.* 2003. J. Anim. Sci., 81: 2213-2218
- Lee JH, *et al.* 2008. Small Rum. Res. 75: 177-184
- Morgan JB, *et al.* 1991. J. Anim. Sci., 69: 3274-3283
- Shackelford SD, *et al.* 1995. J. Anim. Sci., 73: 3333-3340
- Shackelford SD, *et al.* 2004. J. Anim. Sci., 82: 802-807
- Shorthose WR, *et al.* 1990. J. Food Sci. 55: 1-8
- Swan JE *et al.* 1998. Small Rum. Res., 28: 273-280
- Torrescano G, *et al.* 2003. Meat Sci., 64: 85-91
- Tschirhart-Hoelscher TE, *et al.* 2006. Meat Sci, 73: 48-54
- Wheeler TL, *et al.* 1999. J. Anim. Sci., 77: 2444-2451.

Agradecimientos: Los autores agradecen la ayuda de Elías Echegoyen, Miguel Ángel Céspedes y Oscar Bravo por su ayuda en el cuidado y sacrificio de los animales.

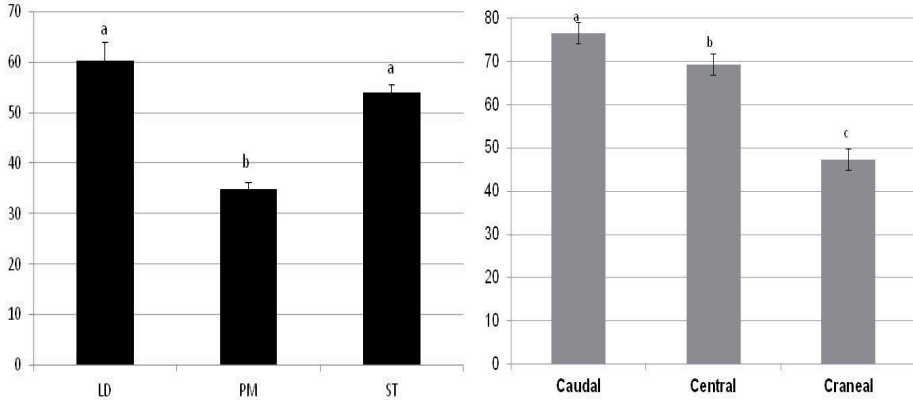


Figura 1. Esfuerzo máximo (N/cm^2) de tres músculos (LD, *Longissimus thoracis et lumborum*; PM, *Psoas major*; ST, *Semitendinosus*) de cabra de Angora (izquierda) y de las tres regiones del m. *Longissimus dorsi* (derecha).

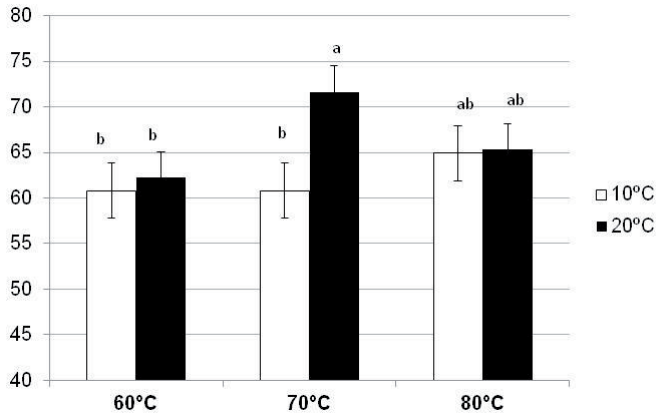


Figura 2. Esfuerzo máximo (N/cm^2) del músculo *Longissimus thoracis et lumborum* de cabra de Angora en función de la temperatura de cocinado (60, 70 y 80 °C) y de enfriado (10 y 20 °C).

EFFECT OF MUSCLE AND COOKING AND CHILLING TEMPERATURES ON INSTRUMENTAL TOUGHNESS OF MEAT

ABSTRACT: Twenty Angora goats were slaughtered to study the effect of cooking and chilling temperatures on the Warner-Bratzler shear force. Also was study the toughness of *Semitendinosus* (ST), *Longissimus thoracis et lumborum* (LD) and *Psoas major* (PM). ST and LD had similar toughness ($P > 0.05$) while PM had lower toughness than those. There was a toughness increment from the craneal side to caudal side ($P < 0.05$). Cooking at 80°C would be recommended because the toughness was intermediate and similar to that of meat cooked at 60 °C and 70 °C. Besides of this, toughness at 80 °C was not influenced by chilling temperature. Following the standard procedures (70°C), best option is chill the meat at 10 °C because values of toughness are closer to the other cooking temperatures proposed.

Keywords: Angora, goat, Warner-Bratzler, shear force

ESTIMACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL COLOR DE LA CARNE DE POTRO A PARTIR DE MEDIDAS INSTRUMENTALES

Ruiz*, M., Insausti, K., Gómez, I., Beriain, M.J. y Sarriés, M.V.
E.T.S.I.A. Universidad Pública de Navarra. 31006 Pamplona. *marta.ruiz@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

La calidad de la carne está determinada por características físico-químicas y sensoriales destacando especialmente el color de la misma, por ser un parámetro que se vincula con el grado de frescura (Rentfrow et al., 2004). Por otro lado, el color de la carne varía a medida que aumenta la exposición al oxígeno. Estos cambios se relacionan con la acumulación de metamioglobina en la superficie de la misma (Kannan et al., 2011).

La raza "Burguete" es una raza equina autóctona de Navarra de gran rusticidad y adaptación a climatologías duras. Se trata de una raza de elevada aptitud cárnica (RC>63 %) pero de gran heterogeneidad en sus canales (Sarriés y Beriain, 2005). Dado que el color de la carne es un importante atributo, resulta de gran interés estudiar la evolución de este parámetro con la exposición al oxígeno en muestras de carne de potro. Existen trabajos previos que determinan la oxidación de la mioglobina y la degradación del color en carne de potro (Sarriés et al., 2005; Sarriés et al., 2011). Sin embargo, hasta la fecha, se han hallado pocos trabajos que realicen estimaciones a cerca de la degradación del color.

El objetivo del presente trabajo fue estimar el tiempo de conservación (TC) del color de la carne de potro a partir de medidas instrumentales de color como son los valores de L^* , a^* , b^* , C^* y H^* , el porcentaje de mioglobina reducida (%Mb), metamioglobina (%MMb) y oximioglobina (%MbO₂) obtenidos por reflectancia .

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se emplearon muestras de carne del *Longissimus dorsi* (LD) de la media canal izquierda madurada 24 horas, procedentes de 4 potros quincenos de raza Burguete. De cada LD, se determinaron los valores K/ S de referencia para calcular los porcentajes relativos de Mb, MbO₂ y MMb según la Guía AMSA (2012) y se cortaron 4 filetes de 1,5-2 cm de espesor para ser llevados a 0, 3, 6 y 9 días de TC. Las chuletas se conservaron en bandejas de plástico transparente cubiertas con un film de PVC permeable al oxígeno en una cámara tipo expositor (Cold Master s.r.l.) a una temperatura comprendida entre 2 y 4 °C. Una vez que la carne alcanzó los TC establecidos, se tomaron las medidas de CIE L^* , a^* , b^* , C^* y H^* de color mediante un espectrocolorímetro Minolta CM-2002 (Iluminante D65 y observador de 10°). Así mismo se tomaron las medidas de reflectancia para el cálculo de porcentaje de %Mb, %MMb y %MbO₂ en superficie en cada momento de TC. Por último, se estudió el atributo "color sensorial" mediante el empleo de un panel entrenado de 20 catadores sobre una escala continua de 0 a 15 cm (Stone et al., 1974). El extremo izquierdo "0 cm" indica el color característico de la carne de potro, el externo derecho "15 cm" indica colores anómalos y el punto medio de la escala "7,5 cm", el límite en el que el color de la carne deja de ser característico. El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete informático SPSS 20.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de los porcentajes relativos de Mb, MbO₂ y MMb medidos a los días 0, 3, 6 y 9 de TC. Se puede observar que el TC presentó efecto significativo en el %MMb ($p<0,001$) y en %MbO₂ ($p<0,05$). Entre los días 0 y 3 de TC se produjo un aumento del %MMb y, en contrapartida, tuvo lugar una pérdida de %MbO₂. La pérdida tan intensa de la estabilidad del porcentaje relativo de MbO₂, podría deberse a la presencia de oxígeno que rápidamente oxidó la oximioglobina. Este resultado podría explicarse a partir de la correlación encontrada entre %MbO₂ y %MMb ($r = - 0,53^{**}$). Sarriés et al. (2005) también indican una baja estabilidad del color de la carne de potro.

En la figura 1 aparecen los resultados obtenidos para la evolución del color sensorial de la carne de potro con el transcurso de tiempo de exposición al aire durante los días 0, 3, 6 y 9. Como puede observarse, el TC mostró un efecto significativo ($p<0,001$) en la respuesta sensorial de la carne, haciéndose visible una degradación progresiva del color característico desde el inicio hasta el final (de 0 a 9 días de TC). Esta degradación del color característico se aprecia en el aumento de la valoración de este atributo por parte los catadores. A días 0 y

3 de TC el color se puede considerar como “color característico”. En este momento, el límite de la escala (75 mm) es superado y para los días 6 y 9 de TC, el color se puede considerar como “color anómalo”. Por lo tanto, la degradación de color sensorial se manifiesta a partir del día 3 de conservación, momento en el que dicho fenómeno se hace notorio y continúa manifestándose hasta el final. Este resultado es inferior al descrito por Lorenzo y Gómez (2012) que indicaron que tras 4 días, el color de la carne aún era aceptado.

Existen varios trabajos que relacionan la valoración sensorial del color de la carne con el contenido en MMb de la misma. Por un lado, MacDougall (1982) expone que cuando el %MMb en carne es superior al 20%, el 50% de los consumidores rechazarían la carne; por otro lado, Van den Oord y Wesdorp (1971) indican que cuando el %MMb en carne es superior al 50%, el 100% de los consumidores rechazarían la carne. Los resultados que aparecen en la tabla 1 muestran un contenido de MMb inferior al 20% únicamente en muestras a 0 días de TC, por lo que cabría esperar que el 100% de los consumidores aceptasen esta carne en dicho momento. Sin embargo, los valores a día 3, 6 y 9 de TC muestran porcentajes de MMb superiores al 50%, lo que indicaría un rechazo total de la carne a partir de 3 días de TC.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos con el empleo de métodos de regresión lineal para estimar el color sensorial a partir de las coordenadas de color. Como puede observarse, el 98% de la variabilidad del color sensorial fue explicada por las variables L^* y a^* . Ambos estimadores mostraron una relación negativa con el color sensorial; lo que indica que cuanto menores sean los valores de L^* y a^* (mayor oscurecimiento y mayor degradación del color rojo) mayor será la degradación sensorial de dicho atributo. Por otro lado, de nuevo la coordenada a^* explicó el 95% de la variabilidad del color sensorial a 3 días de TC. Con este resultado podría decirse que la valoración del color por parte de los catadores a día 3 de TC está prácticamente influenciada sólo por el Índice de Rojo (a^*). Insausti et al. (2001) estimaron la degradación del color en carne de vacuno y también señalan a la coordenada a^* como estimador de dicho fenómeno.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que la carne potro es muy susceptible a sufrir fenómenos oxidativos por la pérdida relativa de oximioglobina y la prematura aparición de metamioglobina. Estos fenómenos conducen a que el color característico de esta carne (color sensorial) no permanezca estable más de 3 días en cámara, ya que en este momento comienzan a aparecer colores anómalos en la superficie de la carne. Por otro lado, la coordenada colorimétrica a^* y en menor grado, la coordenada L^* podrían considerarse como buenos estimadores para la predicción de la degradación de color de la carne de potro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Insausti et al. 2001. Meat Sci. 57: 273-281.
- Kannan et al. 2011. Small ruminant res • Lorenzo y Gómez. 2012. Meat Sci. 92: 610-618
- MacDougall. 1982. Food Chem. 9: 75-88.
- Rentfrow, G. et al. 2004. J. Anim. Sci. 82: 3034–3037.
- Sarriés et al. 2005. Meat Sci. 70: 141–152.
- Sarriés et al. 2005. ITEA n°26 (II): 792-794.
- Sarriés et al. 2011. 57th ICoMST. Ghent, Belgium.
- Sarriés et al. 2014.
- Stone, H. 1974. Food Tech. 28 (XI): 24-34.
- Van den Oord et al. 1971. J. Food Tech. 6: 1-8.

Agradecimientos: Proyecto RTA2012-00090-C03-00. *Carnicerías de Potro Luis Goñi Osacar y otros*. Universidad Pública de Navarra por la ayuda predoctoral concedida en 2014.

Tabla 1. Media, error estándar y significación de los porcentajes relativos de mioglobina reducida (%Mb), metamioglobina (%MMb) y mioglobina oxidada (%MbO₂), en muestras de carne de potro durante los días 0, 3, 6 y 9 de tiempo de conservación.

	Tiempo de Conservación				EE	Sig.
	0 días	3 días	6 días	9 días		
%Mb	39,92	0,34	5,30	19,62	10,19	n.s.
%MMb	11,50 ^a	65,46 ^b	71,85 ^b	54,42 ^b	6,31	***
%MbO ₂	50,25 ^a	34,24 ^{ab}	22,28 ^b	26,81 ^{ab}	6,55	*

Significación: *** (p<0,001), * (p<0,05), n.s.: no significativo.

EE: error estándar

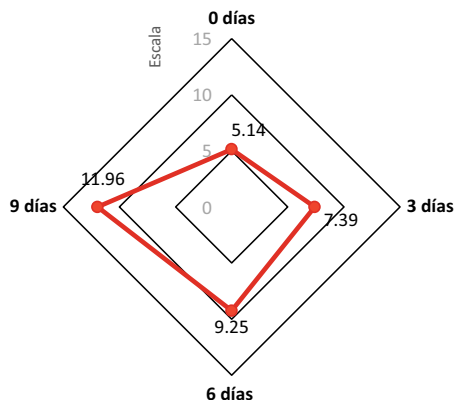


Figura 1. Valoración del color sensorial durante los días 0, 3, 6 y 9 de tiempo de conservación.

Tabla 2. Modelos de regresión lineal para predecir el color sensorial empleando coordenadas de color.

Variable dependiente	ECR	R ²	Sig.	Ecuación
Color sensorial (Evolución general)	1,96	0,98	***	29,67 – 0,93 a* - 0,37 L*
Color sensorial (TC 3 días)	0,24	0,95	**	2,78 – 0,98 a*

Significación: *** (p<0,001), ** (p<0,01), * (p<0,05), n.s.: no significativo.

R²: Coeficiente de correlación de los análisis de regresión.

ECM: Error cuadrático medio

ESTIMATION OF THE DEGRADATION OF COLOR IN FOAL MEAT BASED ON INSTRUMENTAL MEASURES

ABSTRACT: The aim of this work was to estimate the degradation of color in foal meat based on instrumental measures. Four steaks from 4 Burguete male foals were extracted from the muscle *Longissimus dorsi* aged 24 hours *post-mortem*. They were preserved for 9 days in an exhibitor cold storage. The percentage of metmyoglobin grew strongly whereas the percentage of oxymyoglobin during the first three days. This fact could be related to the degradation of red color. On the one hand, it is worth noting the high percentage of metmyoglobin at the 3th day of storage. On the other hand, from the sensorial point of view, the characteristic color of foal meat is preserved for 3 days of storage time. So, sensorial evaluation could be linked to the percentage of metmyoglobin at that same moment. Finally, Red Index (a*) could be a good estimator to predict the deterioration of foal meat colour.

Keywords: foal meat, MMb, meat color, estimation

EFFECTO DE LA RAZA Y EL SISTEMA DE LACTANCIA SOBRE EL COLOR DE LA CARNE DE CABRITOS DE 5 RAZAS ESPAÑOLAS

Panea¹, B., Ripoll¹, G., Albertí¹, P., Álvarez⁴, R., Córdoba², M.G., Argüello³, A. y Alcalde⁴, M.J.

¹ Unidad de Tecnología en Producción Animal. CITA de Aragón. Avda. Montañana, 930, 50.059; ² Universidad de Extremadura. ³ Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

C/Juan de Quesada, nº 30, 35001 Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas; ⁴Dpto. de Ciencias Agroforestales. E.U.I.T.A. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera Km 1- 41013 –Sevilla
* bpanea@aragon.es

INTRODUCCIÓN

En las razas caprinas de aptitud lechera el cabrito es un subproducto, por lo que frecuentemente se desteta y se alimenta con leche artificial (normalmente compuesta por leche de vaca, cereales y grasa vegetal) hasta alcanzar un peso de sacrificio aproximado de 8 Kg. Este manejo reduce los costes de alimentación y posibilita buenos crecimientos. Sin embargo, algunos ganaderos prefieren alimentar a los cabritos con leche natural porque creen que esto incrementa la calidad de la carne (Bañón *et al.*, 2006). El color es el factor de calidad más importante a la hora de la compra puesto que el consumidor lo utiliza como indicador de frescura y en los países mediterráneos se prefiere la carne de colores pálidos (Sañudo *et al.*, 1998). Para estimar el color de la carne, puede utilizarse en matadero la medida del color del músculo recto abdominal, que es el que se usa en el sistema de clasificación comunitario para canales de menos de 13 kg (European Communities, 1994) y además, es mucho más accesible en la canal que el largo dorsal. El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia del sistema de lactancia sobre el color de la carne de los cabritos de 5 razas españolas, medido en dos músculos distintos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se sacrificaron 30 animales de cada una de las siguientes razas: Florida (FL), Cabra del Guadarrama (GU), Payoya (PY), Retinta Extremeña (RE) y Verata (VE). La mitad de ellos habían recibido leche artificial y la otra mitad procedían de un sistema de lactancia natural. Tras 24 horas de oreo a 4°C se midió el color del m. *Rectus abdominis* antes y después de retirar la fascia que lo cubre. Para ello, se colocó detrás un azulejo blanco para normalizar la lectura. En la raza Payoya no existen datos de lactancia artificial. Se extrajo el m. *Longissimus thoracis* y se midió el color del músculo en la cara caudal del mismo tras 1 hora de exposición al oxígeno. Posteriormente, se conservó durante tres días en oscuridad envasado en bandejas cubiertas con film permeable al oxígeno y se volvió a medir el color a los 3 días post-mortem. Las medidas de color se realizaron con un espectrofotómetro Minolta CM-2600d (espacio CIELab, D65, 10°, 0% UV, SCI) registrándose la luminosidad (L*) y los índices de rojo (a*) y amarillo (b*), a partir de los cuales se calcularon la saturación (C*) como $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$ y el tono (H⁰) como $H^0 = \arctg(b^*/a^*) \times 57,29$ expresado en grados. Todas las variables fueron estudiadas por medio de un análisis de varianza y las diferencias entre tratamientos se declararon significativas cuando $P < 0,05$ (Duncan).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La raza afectó significativamente a todas las variables en estudio, tanto en el recto abdominal como en el lomo (Tabla 1). En el recto abdominal, la lactancia también influyó sobre todas las variables y no se encontraron interacciones entre raza y lactancia. El color del recto fue distinto en función de si se medía con o sin fascia ($p < 0,001$) siendo el músculo con fascia más luminoso y con menor índice de amarillo, puesto que la fascia tiene un tono azulado. En el lomo, la lactancia afectó a todas las variables excepto a la saturación y la maduración, a todas las variables excepto al índice de rojo (a*). Al aumentar el tiempo de maduración, aumentaron los valores de las variables. Se encontraron interacciones entre raza y lactancia pero no entre raza y maduración ni entre lactancia y maduración (Tabla 1), lo que está de acuerdo con lo encontrado por otros autores (Alcalde *et al.*, 2009; Ripoll *et al.*, 2009). En la figura 1 se presenta el color del recto medido con la fascia y del color del lomo

a las 24 horas post-mortem (en ambos, L* en abscisas y H⁰ en ordenadas). En ambos músculos, la raza del Guadarrama presentó menor tono y la Florida mayor tono que el resto y la carne de lactancia artificial presentó mayor luminosidad que la de lactancia natural (Tabla 2). Ripoll et al. (2009) encontraron diferencias entre sistemas de lactación, pero estas diferencias dependían de la raza estudiada, lo que coincide con los resultados del presente estudio. Los resultados encontrados coinciden con los de otros autores, que señalan valores para la L* de entre 43 y 53 en varias razas caprinas (Bañón *et al.*, Alcalde *et al.*, 2009, Ripoll *et al.*, 2011) y de entre 42 y 68 para el tono (Ripoll *et al.*, 2011). En la condiciones de este estudio podemos concluir que tanto la raza como el sistema de lactancia influyen enormemente sobre el color de la carne de los cabritos, existiendo además numerosas interacciones entre ellos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Alcalde, M.J. *et al.* (2009). 60th EAAP, poster 39. ● Bañón *et al.* (2006). Meat Sci. 72, 216-221. ● Ripoll, G. *et al.* (2011). Meat Sci. 87, 151-156. ● Ripoll, G., *et al.* (2009). XIII Jornadas sobre producción animal de AIDA, II, 589-591. Sañudo *et al.* (1998). Meat Sci. 49, suppl. 1, S29-S64.

Agradecimientos: Los autores agradecen al INIA la concesión del proyecto RTA2012-23-C03-00 y a las Asociaciones de criadores la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

EFFECT OF BREED AND LACTATION SYSTEM ON SUCKLING KIDS MEAT COLOR FROM FIVE SPANISH BREEDS.

ABSTRACT: We studied the influence of the lactation system on some characteristics of the kid's carcass of 5 Spanish breeds (Florida, Guadarrama, Payoya, Retinta and Verata). We sacrificed 30 animals of each breed, half bred with artificial milk and the other half bred with their dams. We measured colour of M. Rectus abdominis at 1 day post-mortem with and without the covering fascia and colour of m. Longissimus thoracis at 1 and 3 days post-mortem. In both muscles, breed affected all the studied variables. In m. Rectus abdominis, lactation system affected all the variables and there were no interactions between effects. Lightness of Rectus abdominis were higher when measured with fascia. In the Longissimus thoracis, lactation system affected all the variables except C* and the ageing affected all the variables except a*. In Longissimus thoracis, there were found interactions between breed and lactation system and higher the ageing time, higher the values of all variables.

Keywords: color, lactation, Rectus abdominis, Longissimus thoracis

Tabla 1. Significación de los efectos estudiados sobre el color del m. *Longissimus thoracis* y del m. *Rectus abdominis* de cabritos de 5 razas españolas.

	Raza	Lactancia	Fascia	R*L	R*F	L*F
Recto	L*	0,000	0,000	0,001	0,475	0,074
	a*	0,000	0,000	0,000	0,202	0,762
	b*	0,000	0,058	0,000	0,002	0,000
	H ⁰	0,000	0,022	0,000	0,796	0,955
	C*	0,000	0,655	0,000	0,037	0,000
	Raza	Lactancia	Maduración	R*L	R*M	L*M
Lomo	L*	0,000	0,000	0,000	0,008	0,286
	a*	0,000	0,000	0,696	0,000	0,784
	b*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,391
	H ⁰	0,000	0,000	0,041	0,000	0,652
	C*	0,000	0,602	0,000	0,000	0,464

Tabla 2. Medias globales para los efectos estudiados (raza, sistema de lactancia y maduración) para las variables de color de dos músculos de cabritos de 5 razas españolas

	Recto					Lomo				
	Raza	Lactancia		Fascia		Raza	Lactancia		Maduración	
		Nat	Art	Sí	no		Nat	Art	1 d	3 d
L*	51,2	50,3	52,3	54,2	51,2	51,5	50,0	53,0	50,1	52,9
a*	8,4	8,9	7,8	7,6	8,4	2,9	3,7	2,2	2,9	2,9
b*	12,1	11,9	12,2	6,8	12,1	11,2	10,9	11,5	10,5	12,0
H ⁰	55,3	53,4	57,6	46,1	55,3	75,2	71,1	79,1	74,3	76,1
C*	15,1	15,3	14,8	10,8	15,1	12,0	12,0	12,0	11,3	12,7

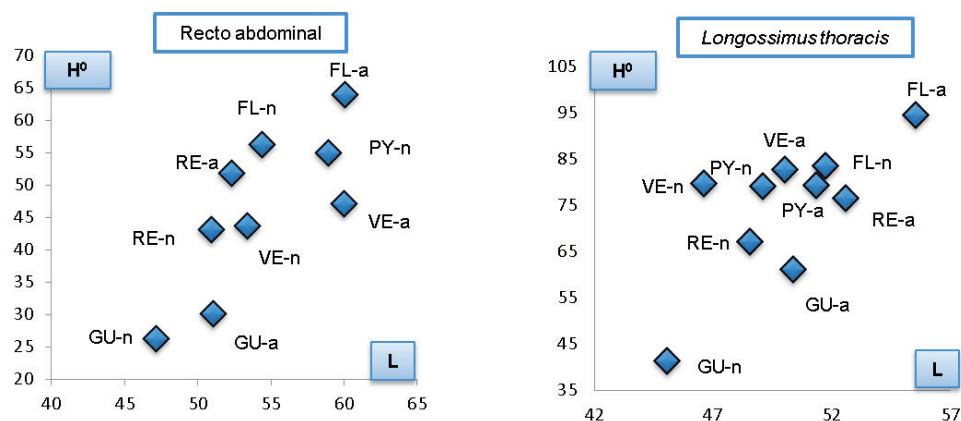


Figura 1. Color del músculo *Rectus abdominis* (izquierda) y del *Longissimus dorsii* (derecha) de cabritos de 5 razas españolas. GU.- Guadarrama; FL.- Florida; PY.- Payoya; RE.- Retinta extremeña; VE.- Verata. a.- artificial; n.- natural. En la raza Payoya no existen datos de lactancia artificial para el *Rectus abdominis*.

EFEECTO DE LA RAZA Y EL SISTEMA DE LACTANCIA SOBRE LA CALIDAD DE LA CANAL DE CABRITOS DE 5 RAZAS ESPAÑOLAS

Panea¹, B., Ripoll¹, G., Albertí¹, P., Córdoba², M.G., Argüello³, A., Alcalde⁴, M.J.

¹ Unidad de Tecnología en Producción Animal. CITA de Aragón. Avda. Montañana, 930, 50.059 ² Universidad de Extremadura. ³ Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. C/Juan de Quesada, nº 30, 35001 Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas; ⁴ Dpto. de Ciencias Agroforestales. E.U.I.T.A. Universidad de Sevilla. Ctra. Utrera Km 1- 41013 –Sevilla

* bpanea@aragon.es

INTRODUCCIÓN

España tiene una de las poblaciones caprinas más grandes de Europa (FAOSTAT, 2010). En las razas caprinas de aptitud lechera el cabrito es un subproducto por lo que frecuentemente se desteta y se alimenta con leche artificial (normalmente compuesta por leche de vaca, cereales y grasa vegetal) hasta alcanzar un peso de sacrificio aproximado de 8 Kg. Este manejo reduce los costes de alimentación y posibilita buenos crecimientos. Sin embargo, algunos ganaderos prefieren alimentar a los cabritos con leche natural porque creen que esto incrementa la calidad de la carne (Bañón *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del sistema de lactancia sobre algunas características de la canal de los cabritos de 5 razas españolas

MATERIAL Y MÉTODOS

Se sacrificaron 30 animales de cada una de las siguientes razas: Florida (FL), Cabra del Guadarrama (GU), Payoya (PY), Retinta Extremeña (RE) y Verata (VE). La mitad de ellos habían recibido leche artificial y la otra mitad procedían de un sistema de lactancia natural. Tras el sacrificio se tomó el peso de la canal caliente y se calculó el rendimiento comercial (peso vivo sacrificio/peso canal caliente) y el índice de compacidad (peso canal/longitud de la canal). Tras 24 horas de oreo se pesaron la cabeza y la asadura y se tomaron diversas medidas lineales de la canal (Ruiz de Huidobro *et al.*, 2005). Igualmente, se extrajo y se pesó la grasa renal. Posteriormente, se extrajo, pesó y diseccionó la espalda de la media canal izquierda, a partir de la cual se evaluó la composición tisular de la canal. Los resultados de la disección se expresan como porcentaje sobre el peso descongelado y las pérdidas de agua se han imputado al músculo. Todas las variables del análisis, excepto el rendimiento a la canal, se covariaron por el peso vivo y las medias mostradas están ajustadas a un peso vivo de 8,7 kg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La raza tuvo efecto significativo sobre todas las variables estudiadas, mientras que el sistema de lactancia afectó a todas las variables excepto a la anchura de la grupa, longitud de la canal y longitud de la pierna. Se encontraron interacciones significativas para el peso vivo, peso de la cabeza y asadura, índice de compacidad y todas las variables de la composición tisular. Los resultados encontrados y la significación de los efectos coincide con lo descrito por otros autores en varias razas caprinas españolas (Alcalde *et al.*, 2009; Panea *et al.*, 2009, 2012; Ripoll *et al.*, 2014). En general, la raza Florida presentó mayor cantidad de grasa renal que el resto, mientras que la Payoya fue la raza menos engrasada. Además, la Payoya presentó un índice de compacidad y un rendimiento a la canal menores que el resto, especialmente en lactancia natural. Los cabritos de lactancia natural de la raza del Guadarrama presentaron una mayor cantidad de grasa subcutánea, lo cual podría deberse a la calidad de la leche de las madres. En las razas Florida, del Guadarrama y Retinta, la lactancia natural originó canales más grandes, con mayor índice de compacidad y mayor cantidad de grasa. Por el contrario, en la raza Verata los animales de mayor tamaño fueron los de lactancia artificial y no se encontró un efecto sobre la cantidad de grasa renal. Por su parte, en la raza Payoya sólo se encontraron diferencias para la grasa renal y el peso de la cabeza y de la asadura. El efecto de la lactancia depende de la raza estudiada y así, Argüello *et al.* (2003) en animales de raza Canaria, describen que el sistema de lactancia influye en las medidas de la canal, pero no en la cantidad de grasa pélvico-renal, mientras que Panea *et al.* (2012), en varias razas caprinas españolas, concluyeron que las mayores diferencias entre sistemas de lactancia vienen dados por un mayor engrasamiento de las

canales de lactancia natural. Las diferencias en el porcentaje de hueso y/o músculo, cuando existieron, fueron menos importantes que la variabilidad presentada por la grasa, lo cual era esperable (Panea *et al.*, 2009). A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que tanto la raza como el sistema de lactancia influyen significativamente sobre las características de la canal de los cabritos, existiendo además numerosas interacciones entre ambos factores. La variabilidad en la cantidad de grasa es mayor que en la cantidad de hueso y/o músculo. La raza Payoya se vio menos afectada por el sistema de lactancia que el resto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcalde, M.J., Ripoll, G., Sañudo, C., Horcada, A., Teixeira, A. y Panea, B. 2009. XXXIV Jornadas SEOC, Actas del congreso, 227-230.
- Argüello, A., Castro, N. y Capote, J. 2003. La Cabra, 6: 24-26.
- Bañón, S., Vila, R., Price, A., Ferrandini, E. y Garrido, M. D. 2006. Meat Sci., 72, 216-221.
- Ruiz de Huidobro, F., Miguel, E., Cañeque, V., Velasco, S. 2005. Monografías INIA, nº 3, pp.83-102
- Panea, B., Ripoll, G., Sañudo, C., Horcada, A., Alcalde, M.J. 2009. AIDA (2009), XIII Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II, 493-495.
- Panea, B., Ripoll, G., Horcada, A., Sañudo, C., Teixeira, A., y Alcalde, M. J. 2012. Spanish J. Agric. Res., 10, 1025-1036.
- Ripoll, G., Albertí, P., Argüello, A., Alcalde, M.J. y Panea, B. 2014. XXXIX Jornadas SEOC, 255-259.

Agradecimientos: Los autores agradecen al INIA la concesión del proyecto RTA2012-23-C03-00 y a las Asociaciones de criadores la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

EFFECT OF BREED AND LACTATION SYSTEM ON CARCASS QUALITY OF SUCKLING KIDS FROM 5 SPANISH BREEDS.

ABSTRACT: We studied the influence of the lactation system on some characteristics of the kid's carcass of 5 Spanish breeds (Florida, Guadarrama, Payoya, Retinta and Verata). We sacrificed 30 animals of each breed, half bred with artificial milk and the other half bred with their dams. We registered hot carcass weight, head, offal and kidney fat weights. Some carcass linear measures were taken. Commercial yield and compactness index of the carcass and tissue carcass composition were calculated. All variables, except carcass yield, were covariated by live weight and means were adjusted to 8.7 kg live weight. Breed had significant effect on all the studied variables, while the lactation affected all variables except rump perimeter and carcass and leg length. There were significant interactions for the live weight, weight of the head and offal, compactness index and all the variables of the tissue composition. The variability for fat was greater than for bone or muscle. The Payoya breed was less affected by the lactacion system than the rest.

Keywords: Goat, carcass, linear measures, tisular composition

Tabla 1. Características de la canal de cabritos de 5 razas españolas. Medias y error estándar de las medias.

	FL		GU		PY		RE		VE		e.e	R	L	R*L
	Nat	Art	Nat	Art	Nat	Art	Nat	Art	Nat	Art				
PV (Kg)	9,6 ^{ax}	8,8 ^{by}	9,6 ^{ax}	7,5 ^{cy}	8,3 ^b	8,4 ^b	9,6 ^{ax}	7,4 ^{cy}	8,0 ^{by}	9,7 ^a	0,009	*	***	***
PCC (Kg)	6,4 ^{ax}	5,6 ^{ay}	6,5 ^{ax}	4,9 ^{by}	4,9 ^b	5,0 ^b	6,2 ^{ax}	4,4 ^{by}	5,3 ^{by}	6,1 ^a	0,065	***	***	n.s.
RC (%)	67,1 ^{ax}	64,3 ^{aby}	67,2 ^a	66,7 ^a	59,2 ^c	59,1 ^c	62,7 ^b	60,8 ^{bc}	66,5 ^a	63,3 ^{abc}	0,039	***	*	n.s.
PG (cm)	33,8 ^{cx}	31,4 ^{cy}	40,7 ^{ax}	33,9 ^{by}	35,8 ^{bc}	34,9 ^{ab}	36,2 ^b	30,6 ^{cy}	37,6 ^{ab}	36,6 ^a	0,029	***	***	n.s.
AG (cm)	9,2 ^{dy}	8,7 ^{cy}	11,3 ^{bx}	9,4 ^{cy}	10,2 ^c	10,6 ^b	11,9 ^{abx}	10,3 ^{by}	12,1 ^{ay}	13,0 ^{ax}	0,011	***	n.s.	n.s.
LC (cm)	42,0 ^{ab}	41,9 ^a	42,8 ^{ax}	41,5 ^{ay}	43,0 ^a	43,1 ^a	42,9 ^{ax}	39,0 ^{by}	40,9 ^b	42,4 ^a	0,015	***	n.s.	n.s.
LP (cm)	29,8 ^a	29,4 ^b	29,4 ^a	28,6 ^b	29,7 ^a	30,5 ^a	28,3 ^a	27,1 ^c	27,9 ^b	28,6 ^b	0,012	***	n.s.	n.s.
CAB (g)	564,1 ^{ax}	525,6 ^{ay}	560,6 ^{ax}	504,2 ^{aby}	473,3 ^{bx}	516,3 ^a	436,7 ^b	478,0 ^c	465,6 ^{by}	495,8 ^{abx}	0,551	***	*	*
AS (g)	557,3 ^a	572,6 ^a	490,6 ^{bx}	392,1 ^{cy}	417,9 ^{cx}	506,3 ^b	329,8 ^d	312,4 ^d	383,5 ^{cdy}	439,9 ^{cx}	0,752	***	***	**
IC (g/cm)	152,7 ^a	134,1 ^{ay}	151,3 ^{ax}	118,3 ^{by}	114,3 ^c	114,7 ^b	142,8 ^{ax}	113,2 ^{by}	129,6 ^{by}	142,9 ^{ax}	0,136	***	***	*
GR (g)	196,6 ^{ax}	106,7 ^{ay}	148,1 ^{bx}	52,5 ^{by}	52,6 ^{cx}	37,5 ^b	155,8 ^{abx}	51,1 ^{by}	113,3 ^b	123,3 ^a	0,458	***	***	n.s.
GSUB (%)	1,1 ^{abx}	0,8 ^{ay}	2,1 ^{ax}	0,8 ^{ay}	0,6 ^c	0,6 ^a	0,7 ^{bc}	0,3 ^b	1,2 ^{bx}	0,8 ^{ay}	0,005	***	***	**
GINT (%)	10,3 ^{bx}	7,7 ^{by}	9,5 ^{bx}	7,2 ^{by}	8,7 ^b	7,6 ^b	12,5 ^{ax}	8,3 ^{by}	12,7 ^a	11,5 ^a	0,021	***	***	n.s.
Músculo (%)	64,2 ^{bx}	66,4 ^{aby}	65,0 ^{ab}	64,9 ^b	65,9 ^a	65,3 ^{ab}	64,2 ^b	66,9 ^{ax}	62,5 ^{cy}	65,2 ^{abx}	0,016	**	**	***
Hueso (%)	23,4 ^a	24,0 ^{bc}	22,1 ^{by}	25,9 ^{ax}	24,0 ^a	25,1 ^{ab}	21,3 ^{by}	23,0 ^{cx}	22,1 ^{bx}	21,1 ^{dy}	0,015	***	***	**

FL- Florida; GU- Cebra del Guadarrama; PY- Payoya; RE- Retinta Extremeña; VE- Verata ee- error estándar de la media; R.- raza; L.-

Lactancia Nat- natural; Art- artificial; PV- peso vivo; PCC- peso canal caliente; RC- Rendimiento canal; GR- perímetro grupa; AG- anchura grupa; LC- longitud canal; LP- longitud pierna; CAB- peso cabeza; PAS.- peso asadura; IC- índice de compactad; GR- peso grasa renal; GSUB- peso grasa subcutánea; GINT- peso grasa intermuscular. n. s.- no significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Los superíndices a, b, c significan diferencias entre razas dentro de sistemas de lactancia y los superíndices x, y significan diferencias entre sistemas de lactancia dentro de raza.

INFLUENCIA DEL CRUCE SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE DE CERDO CELTA SACRIFICADO A 12 MESES

- Lorenzo^{1*}, J.M., Fernández¹, M. Iglesias², A. Carril³, J. A. Domínguez¹, R. y Franco¹, D.
¹Fundación Centro Tecnológico de la Carne. Avenida de Galicia, nº 4, Parque Tecnológico de Galicia. San Cibrao das Viñas, 32900 Ourense. España.
²Departamento de Anatomía y Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, España.
³ASOPORCEL, Recinto Ferial El Palomar s/n.27004. Lugo. España.
*jmlorenzo@ceteca.net

INTRODUCCIÓN

La producción porcina intensiva moderna utiliza razas mejoradas con un alto porcentaje de magro, sometidas a condiciones complejas de manejo y alimentación, lo que determina en algunos casos un descenso apreciable de la calidad de la carne. Actualmente, el consumo de carne en los países desarrollados busca más la satisfacción de un deseo que cubrir una necesidad, y el consumidor comienza a orientar sus preferencias hacia carne “con marca”, es decir con garantía de calidad. La raza porcina Celta fue la más importante en Galicia hasta la segunda mitad del siglo XX, sufriendo a partir de este momento un continuo descenso causado por la introducción de razas foráneas (Fernández *et al.*, 2001; Carril *et al.*, 2012). En la actualidad está incluida en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España como raza autóctona española en peligro de extinción (Real Decreto 2128/2008). El cerdo Celta se caracteriza por una gran rusticidad que le permite una perfecta adaptación a las condiciones de hábitat de los bosques autóctonos gallegos, y hace que estos animales puedan explotarse en régimen extensivo.

Existen en la actualidad nichos de mercado que buscan productos cárnicos de mayor calidad, sin pagar por ello un sobreprecio excesivo al que realizan ahora. En este sentido, la carne del cerdo Celta presenta un alto grado de marmóreo o infiltración que podría ser empleada para la elaboración de productos cárnicos de calidad diferenciada (Gómez y Lorenzo, 2013; Bermúdez *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2014). Estos altos niveles de grasa intramuscular en el producto final son beneficiosos desde el punto de vista de calidad sensorial, pues ofrecen unos productos de calidad excepcional muy demandados actualmente por el consumidor debido a la jugosidad que obedece sobre todo a la abundante infiltración grasa en el magro (Franco y Lorenzo, 2013). Ahora bien las razas autóctonas tienen unas menores tasas de crecimiento e índices de conversión, por lo que sus costes de producción son altos, no siendo tan rentables para los productores y comercializadores. En este sentido, el cruce con otras razas más productivas puede ser usado como una estrategia para mejorar los rendimientos cárnicos sin perjuicio de la calidad de la calidad sensorial (Franco *et al.*, 2014). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del cruce sobre la composición química de la carne de cerdo Celta sacrificado a los 12 meses.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se utilizaron un total de 32 cerdos, provenientes del cruce de hembras de raza Celta con machos de raza Duroc (CxD), Landrace (CxL), Pietrain (CxP) y Mangalica (CxM). Cada uno de los grupos estuvo formado por 8 animales que fueron sacrificados a los 12 meses de edad. Los cerdos fueron manejados y alimentados en un sistema extensivo y dispusieron de parcelas con arbolado, cabañas tipo camping para el descanso, y charca para baños. La alimentación se complementó con pienso concentrado “*ad libitum*”. Los animales fueron sacrificados en un matadero comercial y, a continuación, las canales fueron enfriadas a 4 °C durante 24 horas. Tras el día de refrigeración en el matadero, las canales fueron trasladadas a la planta piloto del Centro Tecnológico de la Carne donde se extrajo sobre la media canal izquierda el músculo *longissimus dorsi* sobre el que se llevaron a cabo las siguientes medidas físico-químicas para evaluar la calidad de esta carne: pH y composición química (humedad, grasa intramuscular, proteína, cenizas y contenido en hierro hemo).

La medida del pH se realizó empleando un pH-metro portátil Hanna Instruments (Eibar, España) equipado con electrodo de penetración de 6 mm de diámetro y una sonda de temperatura. Para medir la cantidad de hematina, mioglobina y hierro hemo se empleó el

método de Hornsey (1956). El contenido en humedad, grasa intramuscular, proteína (Kjeldahl N x 6,25) y cenizas se determinó de acuerdo a las Normas Internacionales ISO 1442:1997, ISO 1443:1973, ISO 937:1978 e ISO 936:1998, respectivamente. Los resultados se analizaron mediante el programa estadístico SPSS (versión 19.0). Para analizar el efecto del cruce se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), utilizando el test de Duncan cuando las diferencias entre las medias era significativa ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los resultados del efecto del cruce sobre las características físico-químicas (pH y composición química) de la carne de cerdo Celta. Los valores de pH no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) obteniéndose valores que oscilaron entre 5,57 y 5,64. Estos valores de pH se encuentran dentro del intervalo de valores encontrados en la bibliografía (Correa *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2014) en distintos músculos de cerdo con distintos genotipos, niveles de ejercicio y nutrición, tipos de aturdimiento, etc., y que, en todos los casos, fueron trasladados al matadero y sacrificados en condiciones apropiadas, evitando al máximo los factores estresantes, como ha ocurrido durante el traslado y el sacrificio de los cerdos Celta empleados en este estudio.

El contenido en humedad se vio afectado ($P < 0,05$) por el tipo de cruce, donde los valores más elevados fueron encontrados para el cruce con Landrace (73,67%), mientras que los niveles más bajos fueron observados en el cruce con Mangalica (72,69%). Estos resultados coinciden con los publicados por Franco *et al.* (2014) quienes observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido en humedad en el lomo de cerdo Celtas cruzados con Landrace y Duroc. El contenido en grasa intramuscular tal vez sea el parámetro de la composición proximal más estudiado y al que se le ha atribuido un mayor efecto sobre la calidad de la carne de cerdo. Un elevado contenido en grasa intramuscular se considera positivo y a tener en cuenta en las estrategias de mejora genética por su influencia positiva sobre la calidad sensorial: sabor, ternura y jugosidad (Fernández *et al.*, 1999). Los valores de grasa intramuscular fueron significativamente ($P < 0,01$) afectados por el tipo de cruce, mostrando el cruce con Pietrain valores inferiores a los otros tres cruces (1,45% vs. 2,50% vs. 2,84% vs. 2,41% para CxP, CxL, CxM y CxD, respectivamente). Estos valores de grasa intramuscular fueron similares a los observados por Temperán *et al.* (2014) en cerdo de raza Celta alimentados con castaña y sacrificados a una edad de 16 meses, pero inferiores a los descritos por Franco y Lorenzo (2013) quienes observaron valores medios de grasa intramuscular de 1,90% en cerdos de tronco Celta sacrificados a 10 meses.

Por otro lado, los cuatro cruces de cerdo Celta estudiados presentaron contenidos en cenizas similares, oscilando sus valores entre 1,20-1,29%. Estos contenidos en cenizas se encuentran dentro del intervalo de valores obtenidos para carne de cerdo. Finalmente el contenido en Fe-hemo reflejó diferencias significativas ($P < 0,01$) respecto al cruce, observándose que el cruce con Mangalica presentaba valores superiores a los otros tres cruces (0,62 vs. 0,51 vs. 0,47 vs. 0,47 mg/100 g para CxM, CxD, CxP y CxL, respectivamente). Estos niveles de Fe-hemo coinciden con lo publicado previamente por Franco y Lorenzo (2013) para cerdo Celta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., and Lorenzo, J.M. (2014a). *Food Control*, 43: 263-269. • Correa, J.A., Faucitano, L., Laforest, J.P., Rivest, J., Marcoux, M., and Gariépy, C. (2006). *Meat Sci.* 72: 91-99. • Fernández, M., Rivero, G., Alonso, M., Rivero, C.J., Pose, H., Justo, J.R., Adán, S., Díaz, R., Rois, D. and Carril, J.A. (2001). Razas autóctonas de Galicia en peligro de extinción. Xunta de Galicia. • Fernández, X., Monin, G., Talmant, A., Mourot, J., and Lebret, B. (1999). *Meat Sci.* 53: 67-72. • Franco, D., and Lorenzo, J.M. (2013). *J. Sci. Food Agri.* 93: 727-734. • Franco, D., Vázquez, J.A., and Lorenzo, J.M. (2014). *Meat Sci.* 96: 195-202. • Gómez, M. and Lorenzo, J.M. (2013). *Meat Sci.* 95: 658-666. • Hornsey, H. C. (1956). *J. Sci. Food Agri.* 7: 534-540. • ISO (1998). ISO 936:1998 standard. • ISO (1973). ISO 1443:1973 Standard. • ISO (1978). ISO 937:1978 Standard. • ISO (1997). D ISO 1442:1997 Standard. • Carril, J.A., Rivero, C.J., Fernández, M., and Lorenzo, J.M. (2012). La raza. En: *Manual del Cerdo Celta*. CETECA (Ed.) Spain. • Lorenzo, J.M., Franco, D., and Carballo, J. (2014). *Meat Sci.* 96: 211-223. • R.D. 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas

ganaderas (BOE n° 23 de 27 de enero de 2009) • Temperán, S., Lorenzo, J.M., Castiñeiras, B.D., Franco, I., and Carballo, J. (2014). Span. J. of Agric. Res. 12: 694-707.

Agradecimientos: A la Diputación de Pontevedra, por la financiación del trabajo en el marco del proyecto Depodeza, cofinanciado en un 70% por FEDER.

Tabla 1. Influencia del cruce sobre la composición química de la carne de cerdo Celta

	Cruce				SEM	Sig
	C×P	C×L	C×M	C×D		
pH	5,59±0,02	5,64±0,04	5,60±0,02	5,57±0,01	0,012	n.s.
Composición química						
Humedad (%)	73,12±0,19 ^{ab}	73,67±0,18 ^b	72,69±0,18 ^a	72,88±0,24 ^a	0,117	*
Grasa intramuscular (%)	1,45±0,13 ^a	2,50±0,30 ^b	2,84±0,29 ^b	2,41±0,21 ^b	0,147	**
Proteína (%)	23,43±0,20 ^b	23,06±0,19 ^{ab}	22,91±0,10 ^{ab}	22,48±0,26 ^a	0,114	*
Cenizas (%)	1,29±0,03 ^b	1,20±0,03 ^a	1,26±0,02 ^{ab}	1,23±0,02 ^{ab}	0,014	n.s.
Hematina (µg/100g)	41,09±2,24 ^a	41,05±3,86 ^a	54,69±2,10 ^b	45,20±1,76 ^a	1,600	**
Mioglobina (mg/100g)	1,06±0,06 ^a	1,06±0,10 ^a	1,41±0,05 ^b	1,16±0,05 ^a	0,041	**
Fe-hemo (mg/100g)	0,47±0,03 ^a	0,47±0,04 ^a	0,62±0,02 ^b	0,51±0,02 ^a	0,018	**

Valores expresados como media ± error estándar

SEM: Error estándar de la media

^{a-b} Los valores en la misma fila con distinto superíndice fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Nivel de significancia del efecto del cruce genético en los atributos sensoriales: no significativo (n.s), $P > 0,05$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Cruce: Celta×Duroc (C×D), Celta×Mangalica (C×M), Celta×Pietrain (C×P) y Celta×Landrace (C×L)

INFLUENCE OF CROSSBREED ON MEAT CHEMICAL COMPOSITION OF CELTA PIG BREED SLAUGHTERED AT 12 MONTHS

ABSTRACT: The effect of crossbreed on meat chemical composition of Celta pig breed slaughtered at 12 months was studied. A total of 32 pigs Celta crossbred (8 for each genotype group) with Duroc, Landrace, Pietrain and Mangalica were used. Animals were reared in an outdoor system and slaughtered at 12 months. After 24 h post-mortem, *longissimus dorsi* muscle was excised and pH and chemical composition (moisture, intramuscular fat, protein, ash and Fe-hemo) were assessed. The pH values did not show significant ($P > 0.05$) differences among groups. Regarding moisture content, statistical analysis displayed significant ($P < 0.05$) differences among crossbreed, since the higher values were observed in samples from crossbred with Landrace breed (73.67%) and the lower values were found in samples from crossbred with Mangalica breed (72.69%). On the other hand, intramuscular fat also showed significant ($P < 0.01$) differences among crossbreed, since the lower values were observed in samples from crossbred with Pietrain (1.45%) compared to the other ones (2.50, 2.84 and 2.41% for samples from crossbred with Duroc, Landrace and Mangalica, respectively). Finally, Fe-hemo content was significantly ($P < 0.01$) affected by the crossbreed, since the higher values were obtained from crossbreed with Mangalica breed (0.62 mg/100 g).

Keywords: Celta pig breed; Chemical composition; Crossbreed; Mangalica pig breed

EFFECTO DEL GENOTIPO EN LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LA CARNE DE TERNEROS PRODUCIDOS EN EL VALLE DEL NANSA (CANTABRIA)

Aldai¹, N., Lavín², P., Jaroso², R., Sanchez-Briñas³, B. y Mantecón², A.R.

¹Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos, UPV/EHU, 01006 Vitoria-Gasteiz.

²Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). Finca Marzanas, 24346 Grulleros (León).

³Fundación Botín, C/ Pedrueca 1, Santander.

*noelia.aldai@ehu.es

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los sistemas de producción de ganado vacuno de carne en zonas de montaña se caracterizan por la diversidad racial y por la venta de la mayor parte de los terneros como pasteros para ser cebados en condiciones intensivas en otras explotaciones (Lavín *et al.*, 2011a,b). En el valle del Nansa (Cantabria) se ha desarrollado una alternativa comercializando las canales de los terneros para incrementar el valor añadido de los productos obtenidos. Teniendo en cuenta el efecto del genotipo y de la alimentación en la calidad del producto (Aldai *et al.*, 2011), en estudios previos se analizaron aspectos como el rendimiento de la canal, calidad de la carne y perfil de ácidos grasos (AG) de la carne de los genotipos: Limusín, Tudanca x Charolés (Aldai *et al.*, 2012; Lavín *et al.*, 2013). En este trabajo se compara la calidad nutricional de carne de ternera obtenida a partir de tres genotipos frecuentes en la zona (Asturiana de los Valles, Tudanca, y Tudanca x Limusín).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 19 terneros machos procedentes de tres 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, y pertenecientes a los genotipos Asturiana de los Valles (AV, n=7), Tudanca (TUD, n=6), y cruce de Tudanca (vaca) x Limusín (toro) (TUDxLIMU, n=6). Los terneros fueron criados en condiciones de pastoreo y lactancia natural con sus madres y suplementados con pienso a libre disposición desde los 30 días de edad hasta el destete (6-7 meses), utilizando tolvas de exclusión que impiden la entrada de las vacas. Una vez destetados fueron estabulados y alimentados con heno de hierba de calidad media de la zona y concentrado, ambos ofrecidos a voluntad. El procedimiento de sacrificio, la evaluación de las canales, la toma de muestras y los análisis fueron los mismos que los descritos en Aldai *et al.* (2012).

Se determinó la composición química del músculo *longissimus thoracis et lumborum* (6ª costilla; n=19) mediante métodos normalizados y el perfil de AG de la grasa subcutánea (SC) mediante GC-FID (Agilent 7890A) (Kramer *et al.*, 2008; Delmonte *et al.*, 2011; Aldai *et al.*, 2012). Para la identificación de los AG se emplearon los estándares y fracciones, mientras que algunos AG se identificaron de acuerdo a 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

Los terneros del genotipo AV fueron más jóvenes al sacrificio (274 días, $P < 0.001$; Tabla 1) dando lugar a canales con mayor conformación y menor engrasamiento en comparación con los demás genotipos que se sacrificaron con mayor edad y presentaron canales con menor conformación y mayor engrasamiento. No hubo diferencias entre genotipos en el peso de las canales. La carne procedente de los terneros del genotipo TUDxLIMU presentó un mayor contenido de grasa en comparación con el genotipo AV, mientras que el genotipo TUD obtuvo valores intermedios (Tabla 1). En cuanto al perfil de AG de la grasa SC, en general, se observaron diferencias significativas (o tendencias, $P < 0,1$) en todos los grupos estudiados excepto en los monoinsaturados (AGM) de tipo *trans*, los poliinsaturados (AGP) de tipo n-3 de cadena larga, y la relación n-6/n-3 (Tabla 2). El genotipo AV presentó un menor contenido en ramificados (AGR), n-3AGP y un mayor contenido en saturados (AGS), 10*t*-18:1 y 7*t*,9*c*-18:2. Mientras que los otros dos genotipos presentaron un mayor contenido en AGR, CLA, 9*c*,11*t*-18:2 y dienos no-conjugados procedentes del metabolismo ruminal junto con un menor contenido en 10*t*-18:1 y 7*t*,9*c*-18:2. Además la grasa SC del genotipo TUD presentó el mayor contenido en AGP, especialmente de tipo n-3.

Tabla 1. Efecto del genotipo (Asturiana de los Valles, Tudanca, y Tudanca x Limusín) en la calidad de la canal y composición química de la carne de ternera

	AV	TUD	TUDxLIMU	e.e.m.	Sign.
Edad (días)	274 ^b	355 ^a	337 ^a	9,001	***
Peso canal (kg)	205	203	209	6,622	ns
Conformación (SEUROP 1-18)	9,57 ^a	6,00 ^b	6,67 ^b	0,521	**
Engrasamiento (1-15)	3,00 ^b	5,00 ^a	5,00 ^a	0,357	*
Humedad (%)	75,8	75,2	74,8	0,241	*
Proteína (%)	21,5	21,0	20,7	0,173	ns
Grasa (%)	1,72 ^b	2,47 ^{ab}	3,34 ^a	0,216	***
Cenizas (%)	1,10 ^a	1,05 ^{ab}	1,02 ^b	0,010	ns

e.e.m., error estándar de la media. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, no significativo. AV: Asturiana de los Valles; TUD: Tudanca; TUDxLIMU: Tudanca x Limusín.

Tabla 2. Efecto del genotipo (Asturiana de los Valles, Tudanca, y Tudanca x Limusín) en la composición de ácidos grasos (AG) de la grasa subcutánea de ternera (% del total de AG).

	AV	TUD	TUDxLIMU	e.e.m.	Sign.
\sum AGS	51,6 ^a	46,4 ^{ab}	45,7 ^b	1,070	*
\sum AGR	1,03 ^b	1,73 ^a	1,63 ^a	0,105	**
\sum AGM	44,0	47,3	49,1	0,998	+
\sum cis-AGM	39,8	42,6	45,3	1,053	+
\sum trans-AGM	4,19	4,73	3,78	0,184	ns
10t-18:1	1,43 ^a	0,56 ^b	0,54 ^b	0,130	***
11t-18:1	0,69 ^c	1,62 ^a	1,21 ^b	0,104	***
10t-/11t-	2,04 ^a	0,35 ^b	0,46 ^b	0,201	***
\sum AGP	2,42 ^{ab}	2,93 ^a	2,08 ^b	0,142	*
\sum n-6	2,19	2,63	1,83	0,136	+
18:2n-6	2,07	2,49	1,70	0,136	+
20:4n-6	0,03	0,04	0,04	0,003	+
\sum n-3	0,23 ^b	0,30 ^a	0,26 ^{ab}	0,011	*
18:3n-3	0,19 ^b	0,25 ^a	0,20 ^{ab}	0,011	*
20:5n-3	0,02	0,02	0,02	0,001	ns
22:5n-3	0,02	0,03	0,03	0,003	ns
n-6/n-3	9,52	8,84	7,48	0,443	ns
P/S	0,05 ^b	0,06 ^a	0,05 ^b	0,003	*
\sum CLA	0,45 ^b	0,76 ^a	0,76 ^a	0,047	**
9c,11t-18:2	0,24 ^b	0,57 ^a	0,58 ^a	0,045	***
7t,9c-18:2	0,10 ^a	0,07 ^b	0,07 ^b	0,005	*
\sum NC-18:2	0,35 ^b	0,71 ^a	0,62 ^a	0,043	***

e.e.m., error estándar de la media. +, $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, no significativo. AGS: AG saturados; AGR: AG ramificados; AGM: AG monoinsaturados; AGP: AG poliinsaturados; P/S, AGP/AGS; CLA, conjugados del linoleico; NC-18:2, dienos no conjugados, AV: Asturiana de los Valles; TUD: Tudanca; TUDxLIMU: Tudanca x Limusín.

Se encontraron diferencias importantes en el perfil de *trans*-18:1 y CLA. Los terneros del genotipo AV presentaron mayor contenido en 6*t*/7*t*/8*t*-, 9*t*- y 10*t*-18:1. Mientras que los TUD y TUDxLIMU presentaron contenidos altos de 11*t*-, 12*t*-, 13*t*/14*t*-, 15*t*- y 16*t*-18:1 (Figure 1a) los cuales son metabolitos principales de la biohidrogenación del 18:3*n*-3 (Bessa *et al.*, 2007). El ácido ruménico (9*c*,11*t*-18:2) fue el CLA mayoritario aunque el perfil isomérico del AV fue diferente al resto de los genotipos estudiados (Figure 1b).

En general, la composición nutricional de la carne de AV fue diferente a los otros dos genotipos, con un perfil de AG de la grasa SC menos saludable a pesar de presentar un menor porcentaje de grasa en la carne. Esto podría ser por una mayor ingestión de concentrado (18:2*n*-6) asociado a una peor capacidad lechera de las madres.

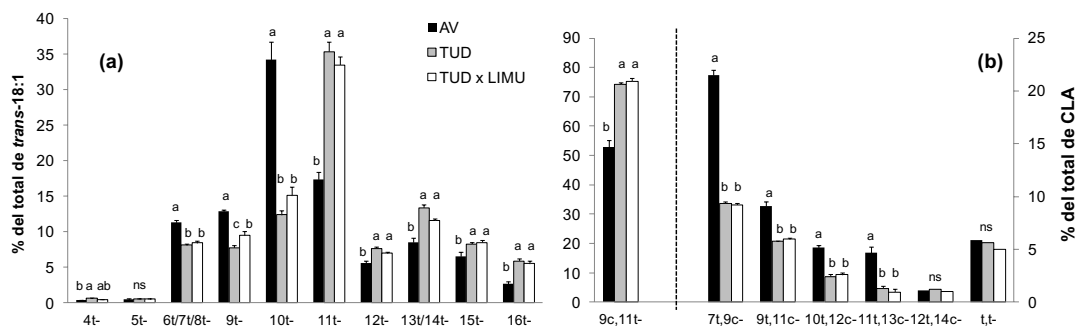


Figura 1. Efecto del genotipo (Asturiana de los Valles, Tudanca, y Tudanca x Limusín) en el porcentaje relativo de cada isómero respecto (a) al total de *trans*-18:1 y (b) al total de CLA de la grasa subcutánea de ternera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldai, N. *et al.*, 2011. *Animal* 5: 1643-1652.
- Aldai, N. *et al.*, 2012. *Meat Sci* 92: 687-696.
- Bessa, R.J.B. *et al.*, 2007. *Eur. J. Lipid Sci Tech.* 109: 868-878.
- Cruz-Hernandez, C. *et al.*, 2004. *J. AOAC Int.* 87: 545-562.
- Delmonte, P. *et al.*, 2011. *J. Chrom. A* 1218: 545-554.
- Kramer, J.K.G. *et al.*, 2008. *Lipids* 43: 259-273.
- Lavín, P. *et al.*, 2011a. *ITEA I*: 67-69.
- Lavín, P. *et al.*, 2011b. *ANEMBE*, pp. 217-219.
- Lavín, P. *et al.*, 2013. *ITEA II*: 745-747.

Agradecimientos: Convenio entre la Fundación Botín (Programa de Desarrollo Rural) y el CSIC (2010-2013, 2014-2015). Agradecimientos a Semark AC Group, S.A., por la colaboración en la realización del trabajo, y al MINECO y a la UPV/EHU por el contrato Ramón y Cajal (RYC-2011-08593) de N. Aldai.

GENOTYPE EFFECT ON THE NUTRITIONAL QUALITY OF BEEF FROM CALVES PRODUCED IN NANSA VALEY (CANTABRIA)

ABSTRACT: This study was designed to compare the carcass characteristics and nutritional quality of veal produced from ‘Asturiana de los Valles’ (AV, n=7), ‘Tudanca’ (TUD, n=6), and ‘Tudanca x Limousin’ cross (TUDxLIMU, n=6) genotypes when allowed to feed freely on mountain pastures naturally suckling their mothers from birth to 6-7 months of age. While weaning, calves also had free access to concentrate. After weaning, calves were fed indoors *ad libitum* grass hay and concentrate. Beef obtained from AV genotype was the leanest but the fatty acid (FA) profile of backfat was different compared to the other two genotypes, especially in terms of the *trans*-18:1 and CLA isomeric profile. Overall, beef obtained from TUD genotype was the healthiest in terms of the nutritionally interesting FAs that had an intermediate muscle fat content.

Keywords: CLA, genotype, *trans*, veal

COMPOSICIÓN DE LOS ADITIVOS EN EMBUTIDO FERMENTADO PORTUGUÉS (CHOURIÇO) DESPUES DEL SECADO

Pires¹, P., Araújo², J.P., Barros¹, M., Fernandes¹, E., Cerqueira³, J., Cadavez⁴, V., Gonzales-Barron⁴, U. y Dias⁴, T.

¹Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Av. do Atlântico, 4990-706 Viana do Castelo, Portugal.

²Centro de Investigação da Montanha (CIMO), Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Refoios do Lima, 4990-706 Ponte de Lima

³Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viana do Castelo

⁴Centro de Investigação da Montanha (CIMO), ESA - Instituto Politécnico de Bragança. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. Campus de Santa Apolónia, Bragança. Portugal.

* ppires@estg.ipv.pt

INTRODUCCIÓN

Los embutidos fermentados portugueses gozan de mucha apreciación entre los consumidores debido a sus características organolépticas. El *chouriço* es un embutido fermentado seco, muy consumido en Portugal, hecho con carne de cerdo y sometido a procesos de maceración, maduración, ahumado y secado a temperaturas bajas (8-15°C). Como ingredientes para la maceración, se utiliza agua, vino tinto, pasta de ajos y pimentón, sal y aditivos. Los conservantes alimentarios son un grupo de aditivos esenciales para la seguridad alimentaria. Otros parámetros como el pH, sal y humedad influyen en la conservación (Honikel, 2008) y las características organolépticas de los embutidos. Según el R (UE) 1129/2011, los fosfatos (E 338) expresados en forma de P₂O₅ con el límite de 5000 mg/kg (500 mg/100 g), los nitritos – nitrito de potasio (E 249) y nitrito de sodio (E 250) están limitados, con un límite en conjunto de 150 mg/kg. Los nitratos – nitrato de potasio (E 252) y nitrito de sodio (E 251) – están limitados en conjunto a 150 mg/kg. La adición de los aditivos puede no ser homogénea y resultar en cantidades variables de niveles residuales de aditivos en el producto final, siendo importante hacer el estudio en diferentes condiciones de recogidas de muestras. Este estudio tuvo como objetivo una caracterización físico-química de los aditivos alimentarios con mayor influencia en la conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron muestreos de embutidos después del secado (n=5), en cada visita al centro de producción. Se investigaron dos lotes de producción (1 y 2) en cada una de las dos fábricas (AC y TC) participantes del Noreste de Portugal, en un total de 20 *chouriços*. Los parámetros estudiados han sido: **nitrito**, resultado presentado en la forma de nitrito de sodio (NaNO₂), **nitrato**, cuyo resultado es presentado en la forma de nitrato de sodio y potasio, (NaNO₃ y KNO₃), el **fósforo**, presentado en la forma de pentóxido de fósforo (P₂O₅), **cloro**, en la forma de cloruro de sodio (NaCl), humedad, cenizas y pH. Han sido utilizados los métodos analíticos de referencia, Normas Portuguesas NP con correspondencia a las normas ISO, excepto para los fosfatos, siendo utilizado un método interno. El laboratorio objeto de este estudio participa regularmente en ensayos inter laboratorios en embutidos. Ha sido realizado un análisis de variancia ANOVA, en el cual las variables dependientes han sido pH, humedad, cloruro de sodio, nitrito de sodio, nitrato de sodio y pentóxido de fósforo, para evaluar el efecto de dos tiempos de fabricación y fábricas (AC1, AC2, TC1, TC2). En este último análisis se ha utilizado el test Tukey para comparación de medias, mediante el paquete estadístico IBM-SPSS (ver. 22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados evidenciaron una gran variación en algunos parámetros entre lotes de producción aún dentro de misma fábrica, lo cual, aparte de las diferencias en la manipulación, es ocasionado también por diferencias en las variables de proceso entre las dos fábricas y entre los lotes de producción. Considerando como criterio de homogeneidad entre réplicas de un mismo lote un coeficiente de variación de 15%, hay más valores heterogéneos en la fábrica AC que en la TC (Tabla 1). Considerando los valores máximos para los aditivos, se cumplen los límites para los nitritos en ambas fábricas, pero no para los nitratos, cumpliendo en la fábrica AC pero no en la TC. Ésta presenta en todos los lotes un

valor de nitratos por encima del valor paramétrico. Con respecto a los fosfatos, ambas fábricas presentan productos que no cumplen el R UE (> 500 mg/kg). Comparando los productos de la fábrica AC y TC, se verifica que hay diferencias significativas ($p < 0,0001$) para todos los parámetros excepto para el pH. Además se verifica que no hay diferencia entre los productos del lote 1 y 2 de la fábrica AC, con excepción en el pH. Con respecto a la fábrica TC, no hubo diferencia entre los productos de los lotes 1 y 2, con excepción del pH y NaNO_3 (y KNO_3). Asumiendo estos resultados, la fábrica TC tiene que mejorar su proceso, teniendo como misión disminuir los niveles de nitratos y fosfatos para los límites reglamentados. Por otro lado, la fábrica AC necesita controlar la adición de fosfatos. Hay que destacar que esta fábrica, por el hecho de presentar valores de nitratos y de nitritos reducidos, puede presentar sensibilidad al crecimiento microbiológico. Ambas fábricas deberán evaluar las etapas del proceso de producción de embutidos con características más uniformes. Los productos de las dos fábricas presentan valores de nitritos reducidos, menor que 6,57 mg/kg. La bibliografía refiere un valor medio de concentración por debajo de los 20 mg/kg para los nitritos en la carne procesada (González y Díez, 2002). Normalmente los valores de los nitritos son inferiores a la de los nitratos, porque ocurre la oxidación de nitrito en nitrato durante el procesado. Este mecanismo presenta además un efecto anti-oxidante, evitando la oxidación de los lípidos. Por otro lado, los nitrato también disminuyen su concentración a largo del tiempo de almacenamiento. Sin embargo esta disminución es más lenta en productos con pH más elevado. Los valores elevados de nitratos en la fábrica TC pueden disminuir con el tiempo, a pesar de esta fábrica presentar en uno de los lotes los valores de pH más elevados. Los valores de estas sales, así como de fosfato y cloruro de sodio son más elevados en los dos lotes de la fábrica TC. Como conclusión, puede decirse que el *chouriço* es un producto cárnico que puede ser consumido crudo. Para eso son adicionados aditivos que actúan como antioxidantes, en el caso del nitrito, y como preventivos o inhibidores del crecimiento microbiano. Las concentraciones de estas sales tienen que ser controladas, pero sus efectos positivos se superponen a la posibilidad de problemas por crecimiento de microorganismos perjudiciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Honikel, K-O., 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* 78: 68-76.
- González B., Díez, V. 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of "chorizo"- a Spanish dry cured sausage. *Meat Science* 60: 295-298.

Agradecimientos: Esta investigación se realizó dentro del proyecto PTDC/AGR-TEC/3107/2012, financiado por la Fundación Portuguesa de Ciencia y Tecnología (FCT)/Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).

FOOD ADDITIVES COMPOSITION OF A PORTUGUESE TRADITIONAL FERMENTED SAUSAGE (CHOURIÇO) AFTER DRYING

ABSTRACT: *Chouriço* is a Portuguese dry-fermented sausage, which is much appreciated among consumers and highly consumed due to its organoleptic characteristics. Hence, the objective of this study was to investigate the food additive composition in dry products and comparison with the values in UE Regulation. The maximum limits allowed, according to Reg (EU) 1129/2011, are met for nitrite in both factories, with values well below the limit of 150 mg/kg (between 0,42-8,01 mg/kg). For nitrate salts the values are below the maximum limit in one production (between 10,1-22,6 mg/kg) but above the maximum level (> 150mg/kg) in another production (above 164,5 mg/kg). Regarding phosphates, both factories have their products not meeting the EU Reg (> 500 mg / kg). The *chouriço* is a meat product that can be consumed raw. To this product are added additives which act as antioxidants, in the case of nitrite, and as preventive or inhibitors of microbial growth. The concentrations of these salts have to be controlled, but its positive effects are superimposed on the possibility of problems originated with growth of microorganisms.

Keywords: *Chouriço*, food additives, meat products.

Tabla 1. Análisis físico-químicos de los chouriços (cuatro lotes de dos fábricas en dos tiempos).

Param.		AC1	AC2	TC1	TC2	Sig.	Fáb.	Ép.
pH	Media ±DT	5,25 ^a ±0,04	5,45 ^b ±0,07	5,31 ^a ±0,02	5,69 ^c ±0,04	***	NS	***
	Min / Max	5,2 / 5,3	5,3 / 5,6	5,3 / 5,3	5,6 / 5,7			
	C. Var.	0,81	1,32	0,30	0,62			
Humedad (%)	Media ±DT	42,0 ^a ±6,97	38,9 ^a ±4,71	54,2 ^b ±1,89	51,0 ^b ±3,41	***	***	NS
	Min / Max	31,4 / 47,2	30,8 / 42,9	51,6 / 56,4	46,5 / 54,9			
	C. Var.	16,58	12,11	3,49	6,69			
NaNO ₂ (mg/kg)	Media ±DT	1,02 ^a ±0,13	0,60 ^a ±0,14	5,79 ^b ±0,72	6,57 ^b ±0,97	***	***	NS
	Min / Max	0,90 / 1,19	0,42 / 0,80	4,76 / 6,53	5,51 / 8,01			
	C. Var.	12,36	22,71	12,44	14,77			
KNO ₃ (mg/kg)	Media ±DT	13,0 ^a ±0,77	18,4 ^a ±2,82	250,8 ^c ±33,70	213,7 ^b ±16,77	***	***	*
	Min / Max	12,0 / 13,8	15,4 / 22,6	229,1 / 310,7	195,6 / 233,6			
	C. Var.	5,95	15,33	13,44	7,85			
NaNO ₃ (mg/kg)	Media ±DT	10,9 ^a ±0,65	15,5 ^a ±2,37	210,8 ^b ±28,33	179,6 ^c ±14,10	***	***	*
	Min / Max	10,1 / 11,6	12,9 / 19,0	192,6 / 261,1	164,5 / 196,4			
	C. Var.	5,95	15,33	13,44	7,85			
P ₂ O ₅ (mg/kg)	Media ±DT	556,6 ^a ±63,9	512,4 ^a ±66,3	831,2 ^b ±16,1	792,9 ^b ±65,4	***	***	NS
	Min / Max	454,6/ 617,4	413,1 / 589,3	804,7 / 843,0	727,3 / 859,4			
	C. Var.	11,47	12,93	1,94	8,24			
NaCl (%)	Media ±DT	2,02 ^a ±0,18	1,83 ^a ±0,22	2,47 ^b ±0,04	2,48 ^b ±0,10	***	***	NS
	Min / Max	1,7 / 2,2	1,5 / 2,0	2,4 / 2,5	2,4 / 2,6			
	C. Var.	9,14	12,16	1,53	4,21			

Sig.: Nivel de significación *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; NS no significativo; a≠e b (P<0,05).

CONTAMINACIÓN POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN EL PROCESAMIENTO DE UN EMBUTIDO FERMENTADO PORTUGUÉS (*LINGUIÇA*)

Cadavez*, V., Pereira, A. P., Gomes, A., Silva, F., Estevinho, L., Gonzales-Barron, U., y Dias, T.

Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. Campus de Santa Apolónia, Braganza. Portugal. *vcadavez@ipb.pt

INTRODUCCIÓN

A pesar que los embutidos fermentados portugueses gozan de mucha apreciación entre los consumidores, la producción de los mismos está sujeta a una extensa variabilidad de los procesos, y, a veces, a deficiencias en higiene (Esteves *et al.*, 2006). La *linguiça* es un embutido fermentado seco, muy consumido en Portugal, hecho con carne de cerdo y sometido a procesos de maceración, maduración, ahumado y secado a temperaturas bajas (8-15°C). Como ingredientes para la maceración, se utiliza agua, vino tinto, sal, pasta de ajos y pimentón. Aunque la inocuidad microbiológica de la *linguiça* ha sido poco investigada, un trabajo reciente de meta-análisis de patógenos en carnes y productos cárnicos portugueses concluye que *Staphylococcus aureus* es un patógeno recurrente en los embutidos fermentados portugueses (Xavier *et al.*, 2014), con una incidencia (22,6%, 95% IC: 15,4 – 31,8%) mayor que la *Salmonella* spp. (9,8%, 95% IC: 7,0 – 13,4%) y la *Listeria monocytogenes* (8,8%, 95% CI: 6,5 – 11,8%). Este trabajo tuvo como objetivo investigar los niveles de *S. aureus* – y de otros indicadores de higiene – en el proceso productivo de la *linguiça*, por medio de una serie de muestreos de los ingredientes y carne/embutido en diferentes etapas (maceración, embutido y ahumado/secado) de la producción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los muestreos fueron realizados en tres lotes de producción de dos fábricas de *linguiça*. En cada lote, se hizo un seguimiento al proceso productivo, muestreando carne cruda (n=3), mezcla de la carne con los ingredientes antes del macerado (n=3), mezcla después de 3 ó 4 días de macerado, dependiendo del proceso productivo particular de cada fábrica (n=3), y embutidos después del secado (n=5). Para analizar las muestras de alimentos, 25 g de producto fueron adicionados a 225 ml de BPW y homogenizados por 2 min. Los mesófilos totales y *Enterobacteriaceae* fueron enumerados con placas Petrifilm™ AC e Petrifilm™ EB, respectivamente. Para la cuantificación de *S. aureus* coagulasa positivos se usaron en conjunto los Petrifilm™ STX y Petrifilm™ Staph Express Disk, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las características intrínsecas de los productos (pH y actividad de agua Aw) también fueron cuantificadas desde una perspectiva de evaluación de su estabilidad. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para las variables mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, pH y Aw, con la finalidad de extraer un pequeño número de componentes o factores que retengan tanta información como fuese posible. El análisis se realizó en el software R versión 2.14.2 (R Development Core Team).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados evidenciaron una gran variación en el proceso productivo de la *linguiça* entre las dos fábricas investigadas. Mientras que en la fábrica A se realizó una maduración de aprox. 3 días después del embutido, en la fábrica B, la maduración fue de aprox. 1 día antes del ahumado. Del mismo modo, la duración del proceso productivo de los lotes varió desde 8 a 22 días. El análisis de componentes principales (Tabla 1) indica que los dos componentes extraídos explican hasta un 73% de la variancia total de las 5 variables estudiadas. Las variables que más contribuyeron al componente principal 1 fueron el pH, Aw, mesófilos y *S. aureus*, explicando 46% de la variabilidad de los datos. El hecho que, dentro del mismo componente 1, las concentraciones de *S. aureus* y mesófilos tengan signo positivo, y el pH y la Aw tengan signo negativo, indica que a lo largo del proceso (al disminuir Aw y pH durante la fermentación) hubo una tendencia de estos dos indicadores de higiene y manipulación de alimentos a aumentar. Por otro lado, también demuestra que *S. aureus* tiene capacidad de desarrollar en la *linguiça*, a pesar de la disminución de la Aw (o aumento de la concentración de sal) y de las variaciones en la acidez del medio. Este comportamiento es descrito por el componente 1. En cuanto al componente principal 2, las variables que más contribuyeron fueron la concentración de *Enterobacteriaceae* y la Aw,

explicando un 27% de la variancia total. Nótese que, en este caso, ambas variables tienen una correlación positiva con el componente 2; lo cual sugiere que a medida que la Aw disminuye durante el proceso productivo de la *linguiça*, las *Enterobacteriaceae* tienden a disminuir. Esto queda representado en el componente 2.

Una forma de ilustrar los cambios en las propiedades intrínsecas (pH y Aw) y los niveles microbianos, es mediante una proyección de las observaciones en el espacio bidimensional definido por los dos componentes principales (i.e., funciones lineales de las variables). La Figura 1 muestra las proyecciones de dos lotes de producción de cada una de las fábricas. En ambos casos, se puede apreciar que, al inicio del proceso productivo, la carne cruda presenta niveles de *Enterobacteriaceae* (correlacionado con el componente 2) más altos que de *S. aureus* (correlacionado con el componente 1). Del mismo modo, ambas fábricas exhiben poca diferencia en contaminación microbiana entre las carnes antes de la maceración (carne con ingredientes) y después de la maceración (embutido). En el caso del lote de la fábrica A, se observó un incremento de las *Enterobacteriaceae* hacia el fin de la maduración, mientras que en la fábrica B no se incrementan las *Enterobacteriaceae* hacia el fin del ahumado, pero sí los *S. aureus*. En la proyección de las etapas de producción en los componentes principales (Tabla 1), también se puede apreciar que, en ambos lotes, el producto terminado aparece alejado de las otras fases en lo que respecta a propiedades intrínsecas y calidad microbiológica. En comparación con la carne cruda, el producto terminado presenta menores niveles de *Enterobacteriaceae* y mayores niveles de *S. aureus*. Observe que a medida que transcurre el procesamiento (mezcla, embutido, madurado/ahumado y producto terminado), las concentraciones de *S. aureus* tienden a aumentar. La detección de *S. aureus* en todos los puntos de muestreo es un indicativo de la contaminación continua del producto a través del procesamiento y de la existencia posible de rutas de contaminación cruzada. La presencia de este microorganismo es considerada como un indicativo de procedimientos higiénicos inadecuados, particularmente asociados a la manipulación. Es posible que existan deficiencias en los manipuladores porque en ambas fábricas se observan incrementos de *S. aureus* durante la mezcla (fábrica A; Fig. 1 izquierda) y mayores incrementos en la fábrica B durante la mezcla y el embutido (Fig. 1 derecha). Por otro lado, también indica que la fermentación que ocurre durante las etapas de maduración, ahumado y secado, no inhibe al *S. aureus*, sino que éste continúa a ser viable debido a su resistencia a los cambios en pH y sobre todo a las bajas actividades de agua. En cambio, los recuentos de *Enterobacteriaceae*, aunque no son eliminados completamente, disminuyeron ($p < 0.01$) hacia el final del producto (datos no mostrados), debido a la inhibición que sufren por la disminución de la Aw, así como por las bacterias fermentativas que producen ácidos orgánicos, peróxidos y bacteriocinas.

La *linguiça* es un producto cárnico que puede ser consumido crudo. Por tanto, es imperioso llevar a cabo más investigaciones para controlar la presencia de *S. aureus* en este producto. La producción de metabolitos por parte de las bacterias fermentativas durante las etapas de maduración, ahumado y secado, no asegura la inhibición de *S. aureus*, por lo que deben aplicarse medidas de control en la materia prima e ingredientes, así como mejoras a nivel de manipulación de alimentos e higienización de equipos.

Tabla 1. Correlaciones de las variables con los dos componentes principales extraídos y proporción explicada de la variancia total

Variable	Componente 1	Componente 2	Comunalidad
pH	-0.71	0.13	0.52
Aw	-0.69	0.60	0.84
<i>S. aureus</i>	0.77	0.00	0.59
Mesófilos	0.86	-0.02	0.74
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.02	0.97	0.94
<i>Eigenvalues</i>	2.32	1.32	
Variancia acumulada	46%	73%	

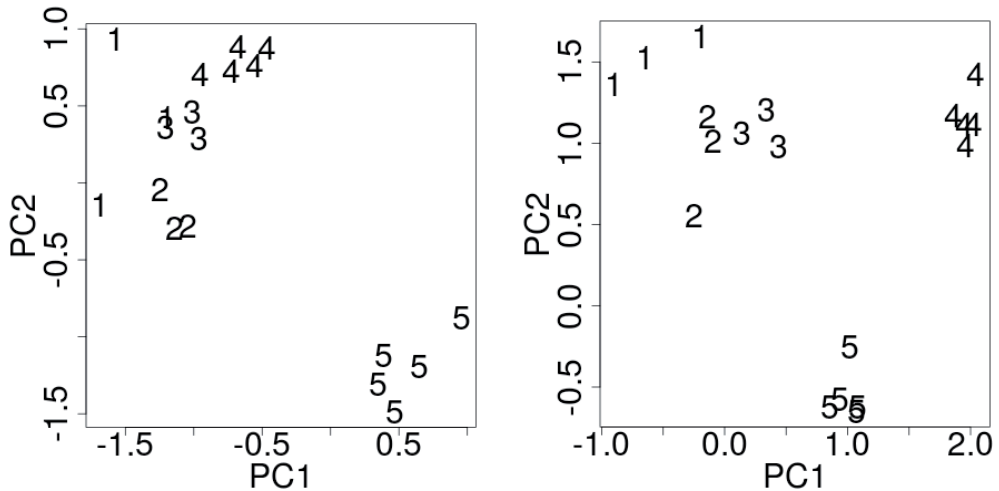


Figura 1. Proyección de las observaciones en el espacio bidimensional definido por los componentes principales 1 (eje-x, 46%) y 2 (eje-y, 26%) para un lote de producción de linguiça de la fábrica A (izquierda) y B (derecha) (1=carne cruda, 2=mezcla de carne e ingredientes, 3=embutido, 4=madurado (izquierda), 4=ahumado (derecha), 5=producto final).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Esteves, A., Saraiva, C., Fontes, M. C., y Martins, C. 2006. Hygienic quality and safety of traditional meat products from particular producer of Tras-Os-Montes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101(557-558): 109 – 114.
- Xavier, C., Gonzales-Barron, U., Paula, V., Estevinho, L., y Cadavez, V. 2014. Meta-analysis of the incidence of foodborne pathogens in Portuguese meats and their products. *Food Research International*, 55: 311 – 323.

Agradecimientos:

Esta investigación se realizó dentro del proyecto PTDC/AGR-TEC/3107/2012, financiado por la Fundación Portuguesa de Ciencia y Tecnología (FCT)/Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER). La Dra. Gonzales-Barron agradece el apoyo financiero provisto por la FCT a través del programa 'Investigator Fellowship' (IF/00570).

CONTAMINATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN THE PRODUCTION LINES OF A PORTUGUESE FERMENTED SAUSAGE (*LINGUIÇA*)

ABSTRACT: *Linguiça* is a Portuguese dry-fermented sausage, which has been found to harbour food-borne pathogens in the past. Hence, the objective of this study was to investigate the levels of total viable counts (TVC), *Enterobacteriaceae*, and *S. aureus* at the key production stages of *linguiça* by depicting their changes using principal component analysis. Unlike *Enterobacteriaceae* counts, which decreased from raw meat to final product, *S. aureus* increased significantly in the meats throughout processing. While *Enterobacteriaceae* was very sensitive to the decrease in water activity, *S. aureus* remained viable and developed during fermentation. The presence of *S. aureus* at all stages should prompt industries to reinforce good hygiene practices in the processing of *linguiça*.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, principal component analysis, pH, water activity

EVALUACIÓN DE LA HIGIENE E INOCUIDAD DE UN EMBUTIDO FERMENTADO PORTUGUÉS (*LINGUIÇA*) A LO LARGO DE SU PROCESAMIENTO

Gonzales-Barron*, U., Pereira, A. P., Gomes, A., Silva, F., Rodrigues, P., Fernandes, C., Estevinho, L., Cadavez, V., y Dias, T.
Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança. Campus de Santa Apolónia, Braganza. Portugal. *ubarron@ipb.pt

INTRODUCCIÓN

A pesar que los embutidos fermentados portugueses gozan de mucha apreciación entre los consumidores debido a sus características organolépticas, en investigaciones recientes se ha reportado que por veces pueden contener microorganismos patogénicos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* debido a la extensa variabilidad del proceso productivo y a deficiencias en higiene (Ferreira et al., 2007). La *linguiça* es un embutido fermentado seco, muy consumido en Portugal, hecha con carne de cerdo y sometida a procesos de maceración, maduración, ahumado y secado a temperaturas bajas (8-15°C). Como ingredientes para la maceración, se utiliza agua, vino tinto, pasta de ajos y pimentón. Este estudio tuvo como objetivo investigar los cambios en las concentraciones de mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en las etapas más importantes (maceración, embutido y ahumado/secado) de producción de *linguiça*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron muestreos de carne cruda (n=3), mezcla de la carne con los ingredientes antes del macerado (n=3), mezcla después de 3 o 4 días de macerado (n=3), y embutidos después del secado (n=5), en cada visita al centro de producción. Se investigaron tres lotes de producción en cada una de las dos fábricas participantes del Noreste de Portugal. Los mesófilos totales y *Enterobacteriaceae* fueron enumerados con placas Petrifilm™ AC e Petrifilm™ EB, respectivamente, siguiendo instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de *S. aureus* coagulasa positivos se usaron en conjunto los Petrifilm™ STX y Petrifilm Staph Express Disk. Para la determinación de *L. monocytogenes*, se adaptaron los procedimientos ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004(E) para detección e ISO 11290-2:1998(E) para la enumeración. Para cada uno de los microorganismos, se ajustaron modelos de análisis de variancia con el fin de determinar si existen cambios significativos en la concentración de los mismos de etapa a etapa, considerando también el efecto de la fábrica. El análisis se realizó en el software R versión 2.14.2 (R Development Core Team).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados evidenciaron una grande variación en la calidad higiénica de las *linguiças* entre lotes de producción – aún dentro de misma fábrica, lo cual, aparte de las diferencias en la manipulación, es ocasionado también por diferencias en las variables de proceso entre las dos fábricas y entre los lotes de producción. Por ejemplo, ocurrió en una fábrica que el tiempo de procesamiento de la *linguiça* varió de 8 a 20 días. Así también, los tiempos y las temperaturas asignadas a cada una de las etapas de producción fueron diferentes. La norma europea EC 1441/2007 establece niveles máximos de indicadores de higiene (5 log CFU/g para mesófilos y 3 log CFU/g para *Enterobacteriaceae*) para las carcasas de cerdo antes del enfriamiento. Aunque esta etapa de producción no es un punto para comparación directa, puede ser utilizada como referencia para nuestros resultados. Así, la carne de cerdo utilizada para los embutidos presentó niveles de mesófilos totales (5.91 log CFU/g; Table 1) y de *Enterobacteriaceae* (3.44 log CFU/g) dentro de lo esperado, que pueden reflejar la multiplicación microbiana durante las etapas posteriores de transporte, almacenamiento y cortado de la carne, y/o contaminación adicional desde los mataderos.

Durante la maceración de la carne con los ingredientes hasta el embutido (2-4 días), los niveles de mesófilos totales no cambiaron considerablemente (5.5 – 5.9 log CFU/g; 95% CI: 5.15 – 5.82 log CFU/g), sin embargo, se incrementaron significativamente hasta el final de la etapa de secado (7.83 log CFU/g; 95% CI: 7.57 – 8.09 log CFU/g), lo que presumiblemente se deba a la multiplicación de los microorganismos fermentativos. En el caso de los recuentos de *Enterobacteriaceae* (indicador de higiene), desde el inicio de la maceración hasta el embutido, éstos no se desarrollaron de forma significativa (3.23 log CFU/g; 95% CI:

2.80 – 3.66 log CFU/g); no obstante, a diferencia de los mesófilos, los recuentos de *Enterobacteriaceae* disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) hacia el final del secado (Tabla 1). Se sabe que durante la fermentación de los embutidos, las bacterias fermentativas producen ácidos orgánicos, peróxidos y bacteriocinas, que podrían inhibir a ciertos géneros de la familia de *Enterobacteriaceae*. Wambui (2013) señala que especialmente *Citrobacter* spp. es susceptible a la flora fermentativa, mientras que *Shigella* spp. tiene susceptibilidad moderada. De acuerdo con las pautas irlandesas de la Autoridad Irlandesa de Inocuidad Alimentaria (Food Safety Authority of Ireland), los lotes de linguiça serían clasificados en su mayoría como satisfactorios en términos de higiene porque los niveles de *Enterobacteriaceae* (1.56 log CFU; 95% CI: 1.23 – 1.90 log CFU/g) se encuentran por debajo del nivel máximo de 4 log CFU/g. Cabe recalcar, sin embargo, que las enterobacterias no son eliminadas durante el procesamiento, y por tantos estos productos listos-para-consumir deben ser manufacturados bajo las más cuidadosas condiciones higiénicas.

En lo que respecta a los patógenos analizados, *S. aureus* tuvo una tendencia a multiplicarse durante el proceso. Desde la carne cruda hasta el fin del secado, la concentración de este patógeno se incrementó significativamente desde 1.77 a 2.58 log CFU/g (Table 1). Este nivel de *S. aureus* no es considerado peligroso (menor que 4 log CFU/g) pero es insatisfactorio (mayor que 2 log CFU/g). Este patógeno es una de las causas más comunes de intoxicación transmitida por alimentos, particularmente por consumo de productos cárnicos y lácteos contaminados, y normalmente es indicativo de un manipuleo inadecuado o excesivo de los alimentos, aunque también puede ser transmitido por superficies de trabajo y equipos mal higienizados.

Tabla 1. Concentraciones de mesófilos totales, *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en etapas de la producción de linguiça

Microorganismos	Etapas	Concentración media (log CFU/g)*	Error estándar (log CFU/g)
Mesófilos totales	Carne cruda	5.91 ^a	0.167
	Masa sin macerar	5.49 ^a	0.170
	Masa macerada	5.70 ^a	0.168
	Producto terminado	7.83 ^b	0.129
<i>Enterobacteriaceae</i>	Carne cruda	3.44 ^a	0.218
	Masa sin macerar	3.23 ^a	0.218
	Masa macerada	3.88 ^a	0.220
	Producto terminado	1.56 ^b	0.169
<i>S. aureus</i>	Carne cruda	1.77 ^a	0.230
	Masa sin macerar	2.03 ^{ab}	0.229
	Masa macerada	2.00 ^{ab}	0.229
	Producto terminado	2.58 ^b	0.177

(*) Dentro de cada grupo de microorganismos, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

El análisis de *L. monocytogenes* demostró que su presencia a lo largo de la producción de linguiça es bastante variable. Este patógeno fue encontrado, aunque en incidencias diferentes, en cada una de las etapas de producción de una de las fábricas de linguiça. Tomando en cuenta solo las muestras de carne y producto contaminadas con *L. monocytogenes*, se observó que su concentración se incrementó ligeramente desde la carne cruda (1.70 log CFU/g) hasta el fin de la maduración (1.90 log CFU/g). Sin embargo, este patógeno sobrevivió a los procesos siguientes de maduración, ahumado y secado, decreciendo sólo ligeramente hasta alcanzar una media de 1.74 log CFU/g en el producto terminado. Estos resultados son concurrentes con los de Ferreira et al. (2007), quienes encontraron presencia de *L. monocytogenes* en 8 a 20% de las muestras de varios embutidos fermentados portugueses. En términos de inocuidad comercial, los lotes de linguiça manufacturados por esta fábrica serían rechazados la mayor parte de las veces en base al criterio microbiológico para *L. monocytogenes* estipulado por la norma europea EC 1441/2007 (ausencia en 25 g en el producto terminado).

La *linguiça* es un producto cárnico que puede ser consumido crudo. Por tanto, es imperioso llevar a cabo más investigaciones para identificar los factores de riesgo que determinan la presencia de *L. monocytogenes* en este producto. Aún con la producción de metabolitos por parte de las bacterias ácido-lácticas durante las etapas de maduración, ahumado y secado, la inocuidad microbiológica de la *linguiça* no puede ser asegurada siempre que la materia prima principal (carne) esté muy contaminada. Del mismo modo, los niveles actuales de *Enterobacteriaceae* y de *S. aureus* en el producto final, aunque no son extremadamente elevados, indican también la necesidad de analizar la calidad microbiológica de los ingredientes así como reforzar las buenas prácticas de manufactura y de higiene en la producción de estos embutidos tradicionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Gibbs, P., Hogg, TT., Gibbs, P., y Teixeira, P. 2007. Microbiological profile of Salpicão de Vinhais and Chouriça de Vinhais from raw materials to final products: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10: 279-283.
- Wambui, J. M. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented camel milk against *Enterobacteriaceae* from came meat. College of Agriculture and Veterinary Sciences, University of Nairobi. (<http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/72574>)

Agradecimientos:

Esta investigación se realizó dentro del proyecto PTDC/AGR-TEC/3107/2012, financiado por la Fundación Portuguesa de Ciencia y Tecnología (FCT)/Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER). La Dra. Gonzales-Barron agradece el apoyo financiero provisto por la FCT a través del programa 'Investigator Fellowship' (IF/00570).

EVALUATION OF THE SAFETY QUALITY OF A PORTUGUESE TRADITIONAL FERMENATED SAUSAGE ALONG PROCESSING

ABSTRACT: *Linguiça* is a Portuguese dry-fermented sausage, which has been found to harbour food-borne pathogens in the past. Hence, the objective of this study was to investigate the changes in the levels of total viable counts (TVC), *Enterobacteriaceae*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* at the key production stages of *linguiça*. Overall, TVC counts did not change considerably from raw meat to stuffing (5.5 – 5.9 log CFU/g), yet it increased significantly up to the end of drying (7.83 log CFU/g). Unlike the *Enterobacteriaceae* counts, which decreased ($p < 0.01$) from batter before maceration (3.23 log CFU/g) to the end of drying (1.56 log CFU), *S. aureus* increased significantly between these two processing stages (2.58 log CFU/g in the finished product). *L. monocytogenes* was detected in the products of one of the factories although their counts decreased after batter maceration. The presence of these two pathogens should also prompt industries to reinforce good hygiene practices in the processing of traditional sausages.

Keywords: Sausage, *Enterobacteriaceae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

CARACTERIZACIÓN DE LA CARNE DE CABALLO: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Belaunzaran¹, X., Lavín², P., Mantecón², A.R. y Aldai^{1*}, N.

¹Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos, Centro de investigación Lascazar Ikerkunea, UPV/EHU, 01006, Vitoria-Gasteiz.

²Instituto de Ganadería de Montaña (IGM-CSIC), Finca Marzanas, Grulleros (León).

*noelia.aldai@ehu.es

INTRODUCCIÓN

El consumo de la carne de caballo ha estado asociado al hombre del Paleolítico (Hintz, 1995) pudiendo ser fuente importante de ácidos grasos (AG) n-3 en zonas donde la disponibilidad de plantas y alimentos marinos era mínima debido a las glaciaciones recurrentes (Guil-Guerrero *et al.*, 2013). A lo largo de la historia, el consumo de esta carne ha sufrido importantes variaciones asociadas a razones de tipo religioso, social y/o cultural (Fernández de Labastida, 2011). En la actualidad, la producción de carne equina representa un porcentaje muy bajo sobre la producción mundial de carne (0,25%). En España supone el 0,12% (estabilizado en torno a 7.000 toneladas/año entre 2000-2012; FAO, 2014). Como ocurre con otras especies de abasto, cada zona geográfica está asociada a una raza equina y tipo de manejo (Tragsega 2003), lo que se traduce en una gran variabilidad en la calidad de la carne. El objetivo de este trabajo es contribuir a la caracterización nutricional de la carne equina comercializada en las carnicerías y grandes superficies de la cornisa Cantábrica.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño experimental consistió en un muestreo de carne de caballo (lomo) a nivel de carnicerías y grandes superficies a lo largo de 6 comunidades autónomas situadas en las dos vertientes de la Cordillera Cantábrica (País Vasco, PV; Navarra, NA; Cantabria, CA; Asturias, AS; Galicia, GA; Castilla y León, CL). El muestreo se llevó a cabo en dos épocas (primavera, n=41; invierno, n=41). Se determinó la composición química del músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (LTL; n=82) mediante los métodos normalizados; materia seca (ISO, 1999), proteína (ISO, 2005), grasa (AOCS, 2008) y cenizas (ISO, 2002). Para la obtención de los AG, se liofilizaron 50mg de grasa subcutánea (SC; n=73) y se llevó a cabo una transmetilación directa con metóxido sódico (0,5N). Los AG metilados se analizaron mediante GC-FID (Agilent 7890A) y 2 columnas cromatográficas de 100 m de forma independiente; la SP2560 para el perfil total (Kramer *et al.* 2008) y la SLB-IL111 para los isómeros de los ácidos conjugados del linoleico (CLA; Delmonte *et al.*, 2011). Para el análisis cualitativo se emplearon los estándares comerciales obtenidos de Nu-Check Prep Inc., Supelco y Matreya, las fracciones obtenidas a partir de extracciones en fase sólida con ion de plata (Belaunzaran *et al.*, 2014; Kramer *et al.*, 2008), y la identificación tentativa mediante los tiempos de retención y el orden de elución descritos en la literatura (Alves *et al.*, 2013; Cruz-Hernandez *et al.*, 2004, 2006; Delmonte *et al.*, 2012; Rego *et al.*, 2009; Santercole *et al.*, 2012). Para el análisis cuantitativo se emplearon dos patrones internos (13:0ME y 23:0ME). El análisis estadístico se realizó utilizando IBM SPSS Statistics 22.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición química del músculo LTL se muestra en la Tabla 1. La interacción entre los factores estudiados fue significativa únicamente para el porcentaje de humedad ($P<0,05$). El efecto época de muestreo fue significativo para el porcentaje de cenizas ($P<0,001$) mientras que las diferencias entre regiones fueron significativas ($P<0,001$) para el porcentaje de grasa de la carne. Los valores de grasa de la carne variaron entre 0,37-8,43% siendo las adquiridas en Castilla y León las que presentaron un mayor porcentaje (2,77%). Las adquiridas en Galicia (1,37%) y Asturias (1,12%) fueron las más magras mientras que el resto presentaron un contenido intermedio de grasa.

El perfil de AG de la grasa SC se muestra en la Tabla 2. No hubo interacción entre los factores estudiados. El efecto época fue significativo para los grupos *trans*-monoinsaturados (*trans*-AGM; $P<0,01$) y CLA ($P<0,001$). Por otro lado, hubo efecto de la región de muestreo en diversos grupos de AG estudiados. Las muestras que presentaron un mayor contenido de grasa en la carne (CL>PV>NA>CA) son las que presentaron, en general, un mayor

contenido en AGM (NA>CL>PV>CA>AS>GA) y menor contenido en AG poliinsaturados (AGP). Las variaciones en AGP fueron debidas principalmente al contenido de AGP de tipo n-3 (1,53-27,96%); variabilidad posiblemente asociada a factores genéticos (Juárez *et al.*, 2009), manejo y alimentación (Franco y Lorenzo, 2014), y edad o sexo de los animales (Sarriés *et al.*, 2006).

Tabla 1. Efecto de la época y región de muestreo en la composición química (%) de la carne de caballo (n = 41 por época de muestreo).

Composición (%)	Época				Región				e.e.m.	E	R	ExR
	Prim	Invi	PV	NA	CA	AS	GA	CL				
Humedad	73,9	72,9	73,1	72,9	73,4	74,2	73,9	72,8	0,181	**	ns	*
Proteína	23,2	23,7	23,4	23,4	23,8	23,3	23,7	23,2	0,181	ns	ns	ns
Grasa	1,99	1,97	2,42 ^{ab}	2,31 ^{ab}	1,63 ^{ab}	1,12 ^a	1,37 ^a	2,77 ^b	0,136	ns	***	ns
Cenizas	1,63	1,31	1,42	1,45	1,47	1,46	1,42	1,62	0,035	***	ns	ns

ns: $P>0,05$; *: $P<0,05$; **: $P<0,01$; ***: $P<0,001$; e.e.m.: error estándar de la media.

Prim: Primavera; Invi: Invierno; PV: País Vasco; NA: Navarra; CA: Cantabria; AS: Asturias; GA: Galicia; CL: Castilla y León; E: época; R: región; ExR: época x región.

Letras diferentes en una misma línea indican diferencias significativas ($P<0,05$)

Tabla 2. Efecto de la época y región de muestreo en la composición de AG (%) de la grasa subcutánea de caballo (primavera, n = 37; invierno, n=36).

Composición (%)	Época				Región				e.e.m.	E	R
	Prim	Invi	PV	NA	CA	AS	GA	CL			
ΣAGS	37,4	38,2	38,7	36,8	37,1	37,6	36,6	38,4	0,295	ns	ns
ΣAGR	0,57	0,51	0,46 ^{ab}	0,43 ^a	0,69 ^b	0,66 ^{ab}	0,69 ^b	0,44 ^a	0,025	ns	***
Σ <i>cis</i> -AGM	37,3	36,1	38,1 ^{bcd}	42,0 ^d	34,0 ^{abc}	32,3 ^{ab}	30,2 ^a	40,1 ^{cd}	0,792	ns	***
Σ <i>trans</i> -AGM	0,17	0,15	0,15	0,16	0,18	0,16	0,16	0,16	0,004	**	ns
ΣAGM	37,4	36,2	38,2 ^{bcd}	42,2 ^d	34,1 ^{abc}	32,5 ^{ab}	30,3 ^a	40,2 ^{cd}	0,793	ns	***
Σn-6	12,5	11,6	12,2	14,0	10,9	11,7	9,79	13,0	0,483	ns	ns
Σn-3	11,6	13,1	10,0 ^{ab}	6,17 ^a	16,7 ^{bc}	17,1 ^{bc}	22,1 ^c	7,48 ^{ab}	1,061	ns	***
ΣCLA	0,10	0,07	0,08	0,10	0,11	0,09	0,08	0,09	0,004	***	ns
ΣAGP	24,1	24,7	22,2 ^{abc}	20,2 ^a	27,6 ^{bcd}	28,8 ^{cd}	31,9 ^d	20,5 ^{ab}	0,791	ns	***

ns: $P>0,05$; *: $P<0,05$; **: $P<0,01$; ***: $P<0,001$; e.e.m.: error estándar de la media.

Prim: Primavera; Invi: Invierno; PV: País Vasco; NA: Navarra; CA: Cantabria; AS: Asturias; GA: Galicia; CL: Castilla y León; E: época; R: región; AGS: AG saturados; AGR: AG ramificados; AGM: AG monoinsaturados; CLA: ácido linoleico conjugado; AGP: AG poliinsaturados.

Letras diferentes en una misma línea indican diferencias significativas ($P<0,05$)

Se llevó a cabo una clasificación de las muestras según su contenido en n-3AGP (<6%, n=26; 6-18%, n=21; y >18%, n=26) para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos. En el análisis de componentes principales empleando únicamente las variables asociadas al perfil de AG de la grasa SC (Figura 1), los componentes 1 y 2 explicaron un 64,6% de la variabilidad de las muestras y estas se agruparon en función de su contenido total en n-3AGP. Las muestras de grasa SC con un contenido alto en n-3 (>18%) se asociaron con todos estos AG individuales de la serie n-3, 20:4n-6, AG ramificados y AGS de cadena corta. Las muestras con contenido medio (6-18%) y bajo (<6%) de n-3 se asociaron principalmente con los AGM, n-6AGP (18:2n-6 y 20:2n-6) y AGS de cadena media y larga (>15C).

En general, el efecto de la región fue más significativo que el efecto de la época, posiblemente debido a las diferencias raciales y al sistema de producción. La carne de caballo se caracteriza por su bajo contenido en grasa y alto contenido en AGP de tipo n-3.

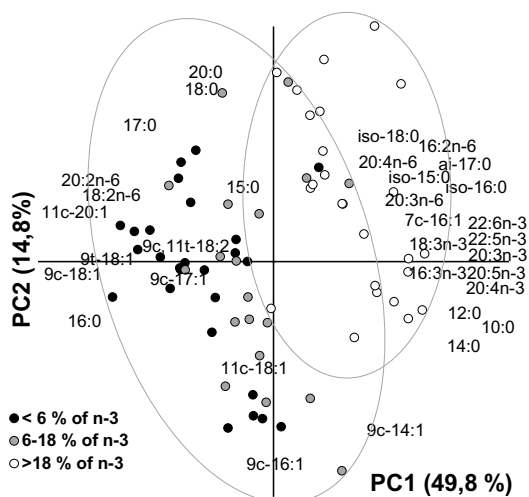


Figura 1. Representación gráfica de las variables y distribución de las muestras en el sistema de coordenadas bidimensional definido por PC1 y PC2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves *et al.*, 2013. Plos One 8: 1-9
- AOCS. 2008. Urbana IL: AOCS.
- Belaunzaran *et al.*, 2014. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116: 1621-1625.
- Cruz-Hernandez *et al.*, 2004. J. AOAC Int. 87: 545-562.
- Cruz Hernandez *et al.*, 2006. AOCS Publishing 3: 45-93
- Delmonte *et al.*, 2011. J. Chromatogr. A 1218: 545-554.
- Delmonte *et al.*, 2012. J. Chromatogr. A 1233: 137-146
- FAO. 2014. http://faostat3.fao.org/download/Q/*E (2014/09/27).
- Fernández de Labastida, I. 2011. Tesis Doctoral. UPV/EHU.
- Franco, D., & Lorenzo, J. M. 2014. Meat Sci. 96: 327-334.
- Guil-Guerrero *et al.*, 2013. Int. Food Res. J. 20: 3249-3258.
- Hintz, H. f. 1995. J. Equine Vet. Sci. 15: 336-339.
- ISO. 1999. Standard 6496:1999.
- ISO. 2002. Standard 5984:2002.
- ISO. 2005. Standard 5983:2005.
- Juárez *et al.*, 2009. Meat Sci. 83: 224-228.
- Kramer *et al.*, 2008. Lipids 43: 259-273.
- Rego *et al.*, 2009. J. Dairy Sci. 92: 4530-4540
- Santercole *et al.*, 2012. Lipids 47: 329-344.
- Sarriés *et al.*, 2006. Meat Sci. 70: 141-152.
- Tragsaga. 2003. MAPA.

Agradecimientos: Al Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco (beca predoctoral de X. Belaunzaran) y al Ministerio de Economía y Competitividad y a la UPV/EHU (contrato 'Ramón y Cajal RYC-2011 a 08593' de N. Aldai). Este trabajo ha sido financiado por la UPV/EHU (EHUA13/29, ZALDITRANS).

CHARACTERIZATION OF HORSE MEAT: CHEMICAL COMPOSITION OF MUSCLE AND FATTY ACID PROFILE OF SUBCUTANEOUS FAT

ABSTRACT: Horse-meat survey was performed along the northern Spanish regions in order to characterize its nutritional quality (chemical composition and fatty acid (FA) profile). Samples were collected in spring (n=41) and winter (n=41) of 2013. In general, the effect of collection period was low while region effect was significant for the muscle fat content. The higher fat content was associated with a higher monounsaturated FA (MUFA) but lower polyunsaturated FA (PUFA) content in horse backfat. The variation observed in PUFA content was mainly due to variation in n-3 content (1,53-27,96%) that could be associated to genetic, feeding and management practices. Three groups of samples were differentiated according to their n-3 content in backfat: 1) <6%, 2) 6-18%, and 3) >18% n-3 PUFA. Backfat samples with highest n-3 content were clearly differentiated in the Principal Component Analysis which were essentially related to individual n-3, 20:4n-6, branched FA and short-chain saturated FA. The other two groups were related to MUFA and n-6AGP and other SFA.

Keywords: horse-meat, production, n-3 fatty acids, branch-chain fatty acids.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA CARNE DE CORDERO COMERCIALIZADA EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO Y NAVARRA

Bravo-Lamas, L., Barron, L.J.R., Etaio, I. y Aldai, N.

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos, Centro de Investigación Lascaray Ikergetea, UPV/EHU, Avda. Miguel de Unamuno 3, 01006 Vitoria-Gasteiz.

*noelia.aldai@ehu.es

INTRODUCCIÓN

España es productor importante de carne de cordero en la Unión Europea (Sañudo *et al.*, 1998). Si bien la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) y Navarra no son los territorios pioneros en este tipo de producción, cabe destacar la importancia de la leche de oveja de la raza *Latxa* como materia prima para la elaboración del queso *Idiazabal*. Estas ovejas son criadas en régimen de pastoreo parcial cuyos corderos son alimentados a base de leche materna hasta aproximadamente un mes de vida, cuando son sacrificados (Abilleira, 2010). Actualmente, la comercialización de estos corderos es problemática a nivel local y los productores se ven obligados a exportar sus corderos a otras comunidades autónomas mientras que a su vez, a la CAPV y Navarra se importan corderos de otras regiones nacionales o incluso internacionales. Así pues, existe la necesidad de aportar un valor añadido al cordero local, cuya calidad (en este caso medida por la composición de ácidos grasos, AG) se verá influenciada directamente por la alimentación de su madre (p.e., relación forraje: concentrado, pasto fresco, suplementos lipídicos) (Alves *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2015; Juárez *et al.*, 2008; Shingfield *et al.*, 2013). El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar detalladamente el perfil de AG de la carne de cordero comercializada en la CAPV y Navarra haciendo especial hincapié en los AG tipo *trans* (*trans*-18:1 y ácido linoléico conjugados, CLA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un muestreo (chuletillas de cordero) en 24 establecimientos de la CAPV y Navarra en primavera (n=24) y en invierno (n=24) de 2013 según el patrón de venta publicado por Mediano *et al.* (2009). La grasa subcutánea (SC) de una chuletilla de cada establecimiento, se envasó a vacío y se conservó a -80°C hasta su análisis. Para la determinación de AG, 50mg de grasa SC liofilizada fueron directamente transmetilados con metóxido sódico en metanol (0.5N) (Kramer *et al.*, 1997). Los AG metilados fueron analizados por GC-FID (Agilent Technologies 7890A) con dos columnas cromatográficas de 100m de forma independiente; la SP2560 para el perfil total (Kramer *et al.*, 2008) y la SLB-111 para los isómeros del CLA (Delmonte *et al.*, 2011). Para la cuantificación de AG, se utilizaron dos estándares internos (13:0ME y 23:0ME) y para la identificación de los picos se emplearon estándares de referencia (Nu-Check Prep Inc., Supelco y Matreya), fracciones de AG de las muestras (Ag⁺-SPE de Nu-Check Prep Inc.; Belaunzarán *et al.*, 2014; Kramer *et al.*, 2008) e identificación tentativa mediante los tiempos de retención y el orden de elución descritos en la bibliografía (Alves y Bessa, 2009, 2014; Alves *et al.*, 2013; Cruz-Hernández *et al.*, 2004, 2006; Delmonte *et al.*, 2011, 2012; Destailats *et al.*, 2000; Gómez-Cortés *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009). Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS 20 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de la época de muestreo en la composición (%) de los AG de la grasa SC de las muestras de cordero recogidas se resume en la Tabla 1. Se han representado los grupos y algunos AG individuales de interés. En general, al contrario de lo que se esperaba, no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en la mayor parte de los AG determinados a excepción de algunos isómeros minoritarios de CLA. Sin embargo, se observó una gran variabilidad en cuanto al contenido de AG monoinsaturados tipo *trans* (*trans*-AGM), principalmente debido a los *trans*-18:1. Se observó que cuando las muestras tenían un contenido en *trans*-18:1 inferior al 8%, el ácido vaccénico (VA, 11*t*-18:1) era el isómero *trans*-18:1 principal mientras que cuando el contenido era superior, el 10*t*-18:1 era el isómero predominante (Figura 1).

Tabla 1. Efecto de la época de muestreo (primavera, invierno) en la composición de ácidos grasos (AG) de la grasa subcutánea de la carne de cordero comercial (%).¹

	Primavera (n=24)		Invierno (n=24)		Sign.
∑ AGS	40,9	(0,926)	40,7	(0,987)	ns
∑ AGR	3,59	(0,356)	3,44	(0,288)	ns
∑ iso + anteiso	2,03	(0,0865)	1,89	(0,0927)	ns
∑ AGR-nt	1,56	(0,325)	1,55	(0,266)	ns
∑ AGM	43,0	(0,975)	44,1	(1,01)	ns
∑ cis-AGM	34,0	(0,687)	36,1	(0,918)	ns
∑ trans-AGM	9,00	(0,750)	7,91	(0,781)	ns
10 <i>t</i> -18:1	4,93	(1,01)	5,05	(0,909)	ns
11 <i>t</i> -18:1	1,72	(0,338)	1,02	(0,149)	ns
∑ AGP	5,23	(0,290)	5,43	(0,328)	ns
∑ n-6	3,12	(0,313)	3,70	(0,335)	ns
∑ n-3	0,760	(0,0900)	0,699	(0,0455)	ns
∑ CLA	1,14	(0,152)	0,781	(0,0837)	*
9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA	0,786	(0,147)	0,509	(0,0851)	ns
∑ NC-18:2	4,11	(0,286)	4,40	(0,328)	ns

¹Valor medio (error estándar). * $P < 0,05$; ns, no significativo. AGS, AG saturados; AGR, AG ramificados; AGR-nt, AGR con un grupo metilo en un carbono no terminal; AGM, AG monoinsaturados; AGP, AG poliinsaturados; CLA, ácido linoléico conjugados; NC-18:2, otros dienos no conjugados.

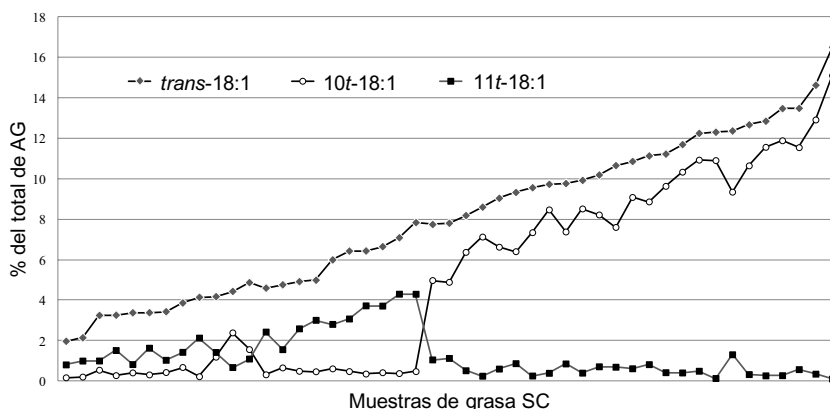


Figura 1. Abundancia relativa del 10*t*-18:1 y 11*t*-18:1 tras ordenar las muestras de grasa SC de cordero (n=48) por su contenido de trans-18:1.

En el análisis de componentes principales (ACP, Figura 2) los componentes 1 y 2 explicaron el 66% de la variabilidad de las muestras. Se observó como las muestras se agrupan por su contenido en trans-18:1 y cómo se asocian con algunas variables. Las muestras con bajo contenido en trans-18:1 (alto contenido de VA) estuvieron positivamente relacionadas con el ácido ruménico, 11*t*,13*c*-CLA, *t*,*t*-CLA, n-3, y 11*t*,15*c*-18:2 entre otros; AG asociados positivamente con la ingesta de pasto/forraje. Por otro lado, las muestras con alto contenido en trans-18:1 (alto contenido de 10*t*-18:1) están positivamente relacionadas con AGR, n-6, y el 10*t*,15*c*-18:2 entre otros. En general, no se encontraron diferencias importantes entre temporadas en el perfil de AG en la carne de cordero, probablemente debido a la amplia variabilidad asociada a las diferentes razas y sistemas de producción. Sin embargo parece que la inclusión de concentrado en las raciones es muy significativa dado el alto contenido en 10*t*-18:1 de las muestras en general.

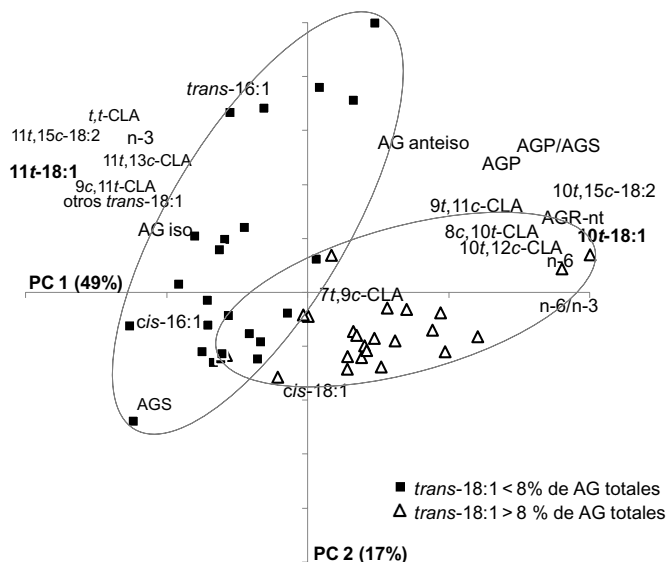


Figura 2. Representación de las variables y de las muestras de grasa subcutánea distribuidas en un sistema coordinado bidimensional definido por PC1 y PC2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abilleira, E., 2010. Tesis Doctoral UPV/EHU • Alves, S. P. *et al.*, 2009. J. Chromatogr. A 1216: 5130-5139 • Alves, S. P. *et al.*, 2013. Plos One 8: 1-9 • Alves, S. P. *et al.*, 2014. Lipids 49: 527-541 • Belaunzaran *et al.*, 2014. EJLST 116: 1621-1625 • Cruz Hernandez, C. *et al.*, 2004. J. AOAC Int. 87: 545-560 • Cruz Hernandez, C. *et al.*, 2006. AOCS Publishing 3: 45-93 • Delmonte, P. *et al.*, 2011. J. Chromatogr. A 1218: 545-554 • Delmonte, P. *et al.*, 2012. J. Chromatogr. A 1233: 137-146 • Destailats, F. *et al.*, 2000. Lipids 35: 1027-1032 • Gallardo, B. *et al.*, 2015. Meat Sci. 102: 79-89 • Gómez-Cortés, P. *et al.*, 2009. J. Lipid Res. 50: 2412-2420 • Juárez, M. *et al.*, 2008. Meat Sci. 79: 203-210 • Kramer, J. K. G. *et al.*, 1997. Lipids 32: 1219-1228 • Kramer, J. K. G. *et al.*, 2008. Lipids 43: 259-273 • Mediano, L. *et al.*, 2009. PA09/04 • Rego, O. A. *et al.*, 2009. J. Dairy Sci. 92: 4530-4540 • Sañudo, C. *et al.*, 1998. Meat Sci. 49: S29-S64 • Shingfield, K. J. *et al.*, 2013. Animal 7:s1 132-162.

Agradecimientos: Al Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco (beca predoctoral de L. Bravo-Lamas y Grupo IT766-13), y al Ministerio de Economía y Competitividad y a la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (contrato 'Ramón y Cajal' RYC-2011-08593 de N. Aldai).

FATTY ACIDS PROFILE OF LAMB MEAT COMMERCIALIZED IN THE BASQUE COUNTRY AND NAVARRE

ABSTRACT: Lamb meat survey was performed in the Basque Country and Navarre in order to characterize its fatty acid (FA) composition emphasizing on *trans* and CLA profiles. Samples were collected in spring (n=24) and winter (n=24) of 2013. Subcutaneous (SC) fat was analyzed by GC-FID. In general, very few differences were observed between collection periods. High variability was observed for *trans*-18:1 content and 2 different groups were clearly identified: 1) when *trans*-18:1 content was < 8%, 11*t*-18:1 was the predominant isomer; 2) but when *trans*-18:1 content was > 8%, 10*t*-18:1 was clearly the main isomer. The 2 groups were also clearly separated in the principal component analysis. The high variability observed among samples could be associated to different breeds and feeding managements.

Keywords: CLA, survey, lamb, *trans*.

CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE LOS QUESOS DE MADRID. DIFERENCIAS EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL Y UTILIDAD DEL ANÁLISIS SENSORIAL PARA LA DESCRIPCIÓN DE LAS PROPIEDADES DE TEXTURA DE LOS QUESOS

Miguel, E*, Álvarez-Teno, A., Iriondo de Hond, M y Mancho, C.

Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA).

Carretera A-2, Km 38,200. Apartado 127. 28800 Alcalá de Henares.

*eugenio.miguel@madrid.org

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un incremento en el número de queserías artesanas en la Comunidad de Madrid que elaboran queso de oveja, cabra, vaca y de mezcla, a partir de leche de las razas autóctonas de la Comunidad de Madrid (raza caprina del Guadarrama y raza ovina Colmenareña) y de otras razas nacionales (raza caprina Murciano-Granadina) o extranjeras (razas ovinas Assaf y Lacaune). Existen quesos de leche cruda y pasteurizada, de pasta blanda y prensada, que utilizan cuajos vegetales y animales, frescos, tiernos, semicurados y curados. Además, se elaboran en zonas diferentes de la Comunidad de Madrid, con sistemas productivos y climas diferentes. Para conocer y diferenciar variedades de quesos es necesario conocer con detalle sus características de apariencia, textura y flavor. La herramienta más adecuada es el análisis sensorial. Se ha analizado esta diversidad de productos, desde el punto de vista sensorial, mediante un panel de jueces entrenados y empleando un análisis descriptivo cuantitativo. Asimismo, se han caracterizado desde el punto de vista de su composición química, propiedades físico-químicas (pH, conductividad eléctrica y color) y propiedades de textura instrumental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se han procesado 52 quesos de oveja y de cabra, así como de mezcla (vaca, cabra y oveja), elaborados tanto a partir de leche cruda como de leche pasteurizada. El tiempo de maduración osciló entre 20 y 300 días. Los quesos se adquirieron en quesería (quesos artesanos) o se compraron en un centro comercial (quesos industriales). El mismo día se realizaron los siguientes análisis: medida instrumental del color, medida instrumental de la textura, del pH y de la conductividad eléctrica, determinación de la humedad y del extracto seco, y análisis sensorial. El resto de la masa de la pasta del queso se distribuyó en bolsas y se envasó en vacío y se congelaron a -40 °C hasta la realización del resto de los análisis (determinación del contenido de sal, proteína, grasa y acidez de la grasa). El pH se estimó mediante medida potenciométrica directa. La textura se determinó mediante un análisis del perfil de textura, con compresión al 50%, utilizando un texturómetro TA-XT2® de Stable Micro Systems. A partir de la curva obtenida, se midieron los parámetros mecánicos de fracturabilidad, elasticidad, dureza, cohesión, adhesividad y resiliencia, y los parámetros secundarios de masticabilidad y gomosidad. La composición química del queso (humedad, grasa, proteína y cloruro sódico) se realizó de acuerdo con la metodología establecida por Miguel et. al., (2002). El análisis sensorial de los quesos se llevó a cabo de acuerdo con la metodología establecida en Miguel et al., (2002), incluyendo, además, otros parámetros: (solubilidad, intensidad de los sabores (ácido, amargo, dulce y salado), sensaciones picante, ardiente y astringente, y persistencia), evaluados de acuerdo con Fresno y Álvarez (2007). El análisis estadístico se realizó mediante el paquete informático Statistica versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis sensorial de los quesos se realizó una clasificación jerárquica (dendrograma) que puso de manifiesto la existencia de seis grupos diferentes de quesos, de acuerdo con su perfil sensorial. A continuación se establecieron seis grupos o conglomerados. Salvo dos excepciones, los quesos que corresponden a una misma quesería y procedimiento de fabricación (leche cruda o pasteurizada; leche de oveja, cabra o mezcla; y tiempo de maduración) quedaron encuadrados en el mismo grupo.

El grupo 1 está formado por 5 quesos de oveja y 3 de cabra, todos ellos elaborados con leche cruda, y que han sido madurados durante 69 días de media. El grupo 2 está formado

por 8 quesos de oveja y 2 quesos de cabra, también fabricados a partir de leche cruda y con un tiempo de maduración medio de 102 días. En el grupo 3 se incluyen 7 quesos de oveja, 3 de cabra y 3 de mezcla (oveja, cabra y vaca), todos ellos elaborados a partir de leche pasteurizada, que proceden de queserías con una alta producción y con un tiempo de maduración medio de 53 días. El grupo 4 está formado por 6 quesos de oveja y 2 quesos de cabra, todos ellos de leche cruda. El tiempo de maduración medio del grupo 4 fue de 124 días. En el grupo 5 se incluyen 9 quesos de oveja de leche cruda y un tiempo de maduración medio de 125 días. Finalmente el grupo 6 está formado por 3 quesos de cabra de leche pasteurizada y un tiempo de maduración medio de 30 días.

Mediante el análisis de la varianza se pone de manifiesto (Tabla 1) que existe un efecto del grupo para todas las variables sensoriales estudiadas, y para las variables porcentaje de proteína, porcentaje de sal, extracto seco, luminosidad, índice de amarillo, pH, conductividad eléctrica y todas las variables instrumentales de textura (dureza, elasticidad, adhesividad, cohesión, masticabilidad, gomosis y resiliencia).

De acuerdo con los resultados del análisis de la varianza, las variables que resultan más importantes para el establecimiento de los grupos de quesos con un perfil sensorial semejante son: en primer lugar el porcentaje de proteínas del queso; a continuación la dureza TPA, el porcentaje de sal, el tiempo de maduración, la masticabilidad TPA (que incluye la dureza, la elasticidad y la cohesión), la gomosis TPA y la luminosidad.

En relación con la calidad sensorial del queso las variables que resultan más importantes para el establecimiento de los grupos con un perfil sensorial semejante son: la firmeza en primer lugar, y a continuación la microestructura, la jugosidad, la friabilidad, la humedad superficial y la intensidad de sabor ácido.

El análisis descriptivo cuantitativo es un instrumento útil para caracterizar los quesos de Madrid desde el punto de vista sensorial. Los quesos que se agrupan en base a este perfil sensorial muestran características semejantes desde el punto de vista sensorial y además de composición química, propiedades físico-químicas y de textura instrumental, y diferentes a los de otros grupos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fresno, M y Álvarez S. 2007. *Instituto Canario de Investigaciones Agrarias*, ISBN 846909887X
- Miguel, E., Blázquez, B., Onega, E. y Ruiz de Huidobro, F. 2002, *Alimentaria*, 335: 101-106.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del IMIDRA (proyecto FP13-QUES). Los autores agradecen a los productores de queso de la Comunidad de Madrid su colaboración a la hora de realizar el estudio y el suministro de quesos. Agradecen también a Pilar Fernández Barrio e Ignacio Sanjuán Gutiérrez por su excelente trabajo técnico, así como la eficaz colaboración de Ruth Sanz García y Gemma Tabaco Moreno en el análisis físico-químico y sensorial de los quesos.

SENSORY CHARACTERIZATION OF CHEESES FROM MADRID. DIFFERENCES IN SENSORIAL PERCEPTION AND USEFULNESS OF SENSORY ANALYSIS TO STUDY CHEESE TEXTURE PROPERTIES.

ABSTRACT:

Fifty-two artisanal and industrial cheeses from Madrid were characterized. Chemical composition, physical-chemical and texture instrumental parameters of cheese, and sensory characteristics of both goat's and ewe's cheese and cheeses manufactured with a mixture of goat's, ewe's and cow's milk were studied. According with assessor's scores from 21 sensory variates, 6 groups of cheeses were established. An effect of cheese group was detected for all sensory variates, and for all instrumental variates but fat percentage, fat acidity and red index. Allocation in cheese's groups depends mainly on protein percentage, TPA hardness, salt percentage, ripening time, TPA chewiness, TPA gumminess and lightness.

Keywords: Cheese; texture; sensory; chemical composition

Tabla 1. Medias de los parámetros sensoriales e instrumentales de los seis grupos de quesos de Madrid establecidos de acuerdo a su perfil sensorial.

	1	2	3	4	5	6	p	Si
Atributos sensoriales								
Elasticidad	4,67 ^{ac}	5,56 ^b	5,27 ^a	6,12 ^b	6,14 ^b	4,27 ^c	0,000	*
Firmeza	3,00 ^a	4,92 ^b	3,75 ^c	6,26 ^d	7,63 ^e	2,94 ^a	0,000	*
Friabilidad	2,85 ^a	3,83 ^b	2,79 ^a	4,29 ^b	6,34 ^c	2,28 ^a	0,000	*
N. masticaciones	10,43 ^a	11,77 ^b	12,39 ^{bc}	13,12 ^c	13,31 ^c	11,64 ^b	0,000	*
Rugosidad superficial	2,92 ^a	3,16 ^a	1,66 ^b	3,73 ^a	5,78 ^c	1,84 ^{ab}	0,000	*
Humedad superficial	5,39 ^a	4,45 ^b	6,04 ^a	3,64 ^c	1,96 ^d	6,85 ^e	0,000	*
Jugosidad	3,53 ^a	2,71 ^b	3,19 ^a	2,35 ^c	1,39 ^d	4,08 ^e	0,000	*
Adherencia	4,57 ^a	3,52 ^b	3,53 ^b	4,10 ^{ab}	2,88 ^{bc}	2,56 ^c	0,000	*
Microestructura	2,28 ^a	3,37 ^b	2,28 ^a	3,59 ^b	5,34 ^c	2,53 ^a	0,000	*
Solubilidad	5,55 ^a	4,46 ^b	4,51 ^b	4,16 ^b	3,25 ^c	4,68 ^b	0,000	*
Color	2,62 ^a	3,72 ^b	2,83 ^{ab}	3,77 ^b	3,08 ^{ab}	1,26 ^c	0,000	*
Sabor ácido	3,50 ^a	3,41 ^a	1,96 ^c	2,63 ^d	3,55 ^a	3,33 ^a	0,000	*
Sabor salado	3,76 ^a	4,05 ^a	2,20 ^c	3,08 ^d	4,11 ^a	3,97 ^a	0,000	*
Sabor amargo	2,60 ^a	2,34 ^a	1,51 ^b	2,07 ^a	2,39 ^a	1,39 ^b	0,000	*
Sabor dulce	1,17 ^a	0,90 ^a	1,36 ^a	0,98 ^a	1,00 ^a	0,97 ^a	0,027	
Picante	2,76 ^a	3,08 ^a	0,92 ^b	2,02 ^c	3,26 ^a	0,88 ^b	0,000	*
Astringente	2,02 ^a	2,42 ^b	1,09 ^c	1,92 ^a	3,07 ^d	1,16 ^c	0,000	*
Ardiente	2,08 ^a	2,31 ^a	0,90 ^c	1,71 ^a	2,65 ^a	0,73 ^c	0,000	*
Acre	1,92 ^a	1,76 ^{ab}	0,70 ^c	1,29 ^b	2,08 ^a	0,74 ^c	0,000	*
Persistencia	5,77 ^{abc}	6,32 ^b	4,93 ^c	6,19 ^b	6,69 ^b	5,26 ^c	0,000	*
Impresión global	5,64 ^a	5,72 ^a	5,60 ^a	6,31 ^b	5,84 ^a	5,61 ^a	0,000	*
Composición química								
% proteínas	21,72 ^a	24,24 ^b	22,63 ^a	25,10 ^b	25,97 ^b	20,44 ^c	0,000	*
% sal	1,98 ^a	2,36 ^a	1,64 ^{ab}	2,00 ^a	2,52 ^a	2,06 ^a	0,000	*
% grasa	29,59 ^a	32,17 ^a	33,92 ^a	28,53 ^a	29,86 ^a	27,69 ^a	0,432	N
% humedad	38,38 ^a	34,84 ^{ab}	37,02 ^a	30,05 ^b	28,22 ^b	42,79 ^a	0,005	†
Acidez de la grasa	2,31 ^a	2,53 ^a	2,19 ^a	2,27 ^a	2,94 ^a	1,17 ^b	0,212	N
Color								
Luminosidad	85,37 ^a	80,56 ^a	83,54 ^a	80,12 ^a	83,54 ^a	91,38 ^b	0,004	†
Índice de rojo	-1,45 ^a	-1,02 ^a	-7,07 ^a	-0,93 ^a	-1,32 ^a	-1,52 ^a	0,566	N
Índice de amarillo	14,18 ^a	17,40 ^a	16,50 ^a	15,35 ^a	15,16 ^a	9,37 ^b	0,012	
Parámetros instrumentales								
pH	5,55 ^a	5,60 ^a	5,44 ^a	5,43 ^a	5,33 ^a	5,67 ^b	0,019	
Conductividad eléctrica	7,28 ^a	8,82 ^a	6,91 ^a	7,84 ^a	10,03 ^b	7,74 ^a	0,011	
Textura instrumental (TPA)								
Dureza (g)	2354,20 ^a	3698,40 ^b	3907,20 ^b	5095,20 ^c	5030,70 ^c	3807,10 ^b	0,000	*
Elasticidad	0,56 ^a	0,74 ^b	0,72 ^b	0,68 ^{ab}	0,75 ^b	0,68 ^{ab}	0,000	*
Adhesividad (g.sec)	28,07 ^{ab}	17,03 ^a	37,62 ^b	22,60 ^a	9,306 ^a	47,04 ^b	0,005	†
Cohesión	0,23 ^a	0,24 ^a	0,41 ^b	0,24 ^a	0,35 ^{ab}	0,42 ^b	0,006	†
Masticabilidad (g)	294,41 ^a	647,92 ^{ab}	1138,20 ^b	807,25 ^{ab}	1403,30 ^c	1063,10 ^{bc}	0,000	*
Gomosidad (g)	532,67 ^a	863,01 ^{ab}	1542,30 ^b	1184,70 ^{ab}	1783,70 ^b	1576,80 ^b	0,003	†
Resiliencia	0,68 ^{ab}	0,78 ^{ab}	0,40 ^{ab}	0,72 ^{ab}	0,94 ^a	0,20 ^b	0,042	
Días de maduración	69,37 ^a	102,27 ^b	52,78 ^a	123,75 ^b	125,00 ^b	30,00 ^c	0,000	*

*** (p ≤ 0,001); ** (p ≤ 0,01); * (p ≤ 0,05) N.S: no significativo

CORRELACIONES ENTRE VARIABLES SENSORIALES E INSTRUMENTALES Y DE COMPOSICIÓN QUÍMICA EN QUESOS DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Miguel¹, E, Álvarez-Teno¹, A, Iriondo de Hond¹, M. y Mancho C¹

¹Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Carretera A-2, Km 38,200. Apartado 127. 28800 Alcalá de Henares. eugenio.miguel@madrid.org

INTRODUCCIÓN

Las características de textura y color son de gran importancia para evaluar la calidad de los quesos, y determinan la aceptabilidad por parte del consumidor. Estos parámetros, a su vez, dependen de la composición química y de las propiedades físico-químicas del queso. En este trabajo se han buscado correlaciones entre parámetros instrumentales, como color de la pasta, pH, conductividad eléctrica, composición química (porcentajes de grasa, proteína, sal y extracto seco), y propiedades de textura instrumental obtenidos mediante un análisis del Perfil de textura (TPA), y variables sensoriales, en muestras de queso de oveja, cabra y de mezcla (oveja, cabra y vaca) de la Comunidad de Madrid, tratando de identificar parámetros que puedan ser útiles para la predicción de las características sensoriales de los quesos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se han procesado 52 quesos de oveja y de cabra, así como de mezcla (vaca, cabra y oveja), elaborados tanto a partir de leche cruda como de leche pasteurizada. El tiempo de maduración osciló entre 20 y 300 días. Los quesos se adquirieron en quesería (quesos artesanos) o se compraron en un centro comercial (quesos industriales). El mismo día se realizaron los siguientes análisis: medida instrumental del color, medida instrumental de la textura, del pH y de la conductividad eléctrica, determinación de la humedad y del extracto seco, y análisis sensorial. El resto de la masa de la pasta del queso se distribuyó en bolsas y se envasó en vacío y se congelaron a -40 °C hasta la realización del resto de los análisis (determinación del contenido de sal, proteína, grasa y acidez de la grasa). El pH se estimó mediante medida potenciométrica directa. La textura se determinó mediante un análisis del perfil de textura, con compresión al 50%, utilizando un texturómetro TA-XT2® de Stable Micro Systems. A partir de la curva obtenida, se midieron los parámetros mecánicos de fracturabilidad, elasticidad, dureza, cohesión, adhesividad y resiliencia, y los parámetros secundarios de masticabilidad y gomosidad. La composición química del queso (humedad, grasa, proteína y cloruro sódico) se realizó de acuerdo con la metodología establecida por Miguel et. al., (2002). El análisis sensorial de los quesos se llevó a cabo de acuerdo con la metodología establecida en Miguel et al., (2002), incluyendo además, otros parámetros: (solubilidad, intensidad de los sabores (ácido, amargo, dulce y salado), sensaciones picante, ardiente y astringente, y persistencia), evaluados de acuerdo con Fresno y Álvarez (2007). Las correlaciones entre parámetros instrumentales y de composición química del queso se realizaron mediante el módulo de correlaciones bivariadas del paquete estadístico SPSS 19.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han encontrado numerosas correlaciones estadísticamente significativas entre variables físico-químicas y variables sensoriales.

Se observa una muy alta correlación ($r=-0,88$) entre la luminosidad medida instrumentalmente y la puntuación subjetiva del color. Muy altas correlaciones se observan entre el porcentaje de proteínas y muchas de las variables sensoriales: rugosidad superficial ($r=0,77$), humedad ($r=-0,83$), firmeza ($r=0,88$), friabilidad ($r=0,83$), jugosidad ($r=0,77$) y estimación de la microestructura del queso ($r=0,81$). También una alta correlación con la solubilidad ($r=-0,77$).

Asimismo los porcentajes de sal y de extracto seco están muy correlacionados con las variables sensoriales. Se observa una alta correlación entre el sabor salado y el porcentaje de sal ($r=0,73$) y la astringencia ($r=0,72$). Altas correlaciones ($r\geq 0,55$) se observan también entre el porcentaje de sal y la rugosidad superficial, la humedad, la microestructura, el sabor ácido y las sensaciones picante, astringente, ardiente y acre, y la persistencia. De las

variables relacionadas con la composición química del queso el porcentaje de grasa es la que muestra una menor correlación con las variables sensoriales, especialmente con las variables de textura. Álvarez et al., (2007) muestra que la dureza de los quesos en una prueba de compresión está más relacionada con el contenido de grasa que de proteína, a diferencia de lo que nuestros resultados sugieren. Otros autores han referido una baja correlación de la dureza con el contenido de grasa (Gwartney et al., 2002).

La conductividad eléctrica está más correlacionada con los atributos sensoriales del queso que el pH. El número de variables sensoriales con los que existe correlación estadísticamente significativa es mayor y además los coeficientes de correlación son mayores.

En relación con las variables de textura (TPA), la dureza instrumental está correlacionada positivamente con la dureza sensorial ($r=0,64$) y el número de masticaciones ($r=0,62$) y negativamente con la jugosidad. La elasticidad TPA se correlaciona fundamentalmente con la adherencia y la solubilidad (correlaciones negativas). En general, todas las variables de textura instrumental están muy correlacionadas con las variables de textura sensorial (salvo la cohesión).

En general las variables de textura sensorial (salvo la adherencia y el número de masticaciones) se correlacionan mejor con el porcentaje de proteína, la adherencia y el número de masticaciones con los parámetros de textura instrumental (dureza y elasticidad TPA) y los parámetros relacionados con el perfil gustativo del queso con el porcentaje de sal. La impresión global sólo está correlacionada con la luminosidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, S., Rodríguez, V., Ruiz, M.E. y Fresno, M. 2007. Arch. Zootec, 56(Sup. 1): 663-666.
- Fresno, M y Álvarez S. 2007. *Instituto Canario de Investigaciones Agrarias*, ISBN 846909887X
- Gwartney, E.A., Foeting, E.A. and Larica, D.K. 2002. *J.Food Sci*, 67: 812-816.
- Miguel, E., Blázquez, B., Onega, E. y Ruiz de Huidobro, F. 2002, *Alimentaria*, 335: 101-106.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del IMIDRA (proyecto FP13-QUES). Los autores agradecen a los productores de queso de la Comunidad de Madrid su colaboración a la hora de realizar el estudio y el suministro de quesos. Agradecen también a Pilar Fernández Barrio e Ignacio Sanjuán Gutiérrez por su excelente trabajo técnico, así como la eficaz colaboración de Ruth Sanz García y Gemma Tabaco Moreno en el análisis físico-químico y sensorial de los quesos

CORRELATIONS BETWEEN INSTRUMENTAL AND CHEMICAL COMPOSITION VARIATES AND SENSORY VARIATES IN CHEESES FROM MADRID

ABSTRACT: The aim of this work was to investigate relationships between chemical composition and instrumental variates with sensory parameters. 52 artisanal and industrial cheeses from Madrid were characterized intended to identify chemical composition, physical-chemical and instrumental parameters that will show a correlation with sensory characteristics. Many of the instrumental analysis were highly correlated to sensory measurements. Lightness was highly correlated to subjective estimation of cheese color. Protein percentage was correlated to many sensory texture characteristics and protein content was better correlated to sensory cheese parameters than fat percentage. Other chemical composition variates (salt percentage and moisture) were highly related to sensory parameters. So, salt content showed a high correlation to salty taste. Electric conductivity was more useful to predict cheese sensory attributes than pH measurements. All instrumental texture variates, but cohesiveness, were highly related to cheese sensory quality parameters. Pleasantness was only correlated to lightness.

Keywords: Cheese; texture; sensory; chemical composition

Tabla 1: Estudio de correlación entre variables instrumentales y de composición química y variables sensoriales

	Variables instrumentales															
	Densidad (g/cm3)	Luminosidad	pH	Conductividad	% Grasa	% Proteínas	% Sal	Índice acidez grasa	Extracto Seco	Dureza	Elasticidad	Adhesividad	Cohesividad	Masticabilidad	Gomosidad	Resiliencia
Rugosidad	0,36**	-0,21	-0,26	0,40**	0,04	0,77**	0,58**	0,14	0,63**	0,35*	0,25	-0,48**	0,01	0,30*	0,27	0,36**
Humedad	-0,30*	0,28*	0,34*	-0,46**	-0,04	-0,83**	-0,59**	-0,22	-0,62**	-0,51**	-0,20	0,49**	0,10	-0,23	-0,22	-0,41**
Firmeza	0,29*	-0,27	-0,33*	0,42**	0,07	0,88**	0,47**	0,35*	0,69**	0,64**	0,32*	-0,46**	0,02	0,38**	0,35*	0,30*
Friabilidad	0,38**	-0,13	-0,32*	0,41**	0,12	0,83**	0,53**	0,30*	0,64**	0,51**	0,27	-0,47**	0,13	0,45**	0,42**	0,27
Adherencia	-0,17	-0,09	-0,06	-0,08	-0,02	-0,22	0,09	-0,10	-0,19	-0,17	-0,54**	0,38**	-0,33*	-0,46**	-0,35*	-0,05
Jugosidad	-0,34*	0,30*	0,33*	-0,45**	-0,10	-0,83**	-0,46**	-0,31*	-0,60**	-0,62**	-0,32*	0,39**	0,01	-0,37**	-0,34*	-0,39**
Nº mastíc.	0,30*	-0,19	-0,09	0,25	0,00	0,46**	-0,03	0,30*	0,21	0,63**	0,31*	-0,01	0,17	0,45**	0,42**	0,09
Microestruct.	0,36**	-0,16	-0,25	0,41**	0,08	0,81**	0,58**	0,30*	0,64**	0,54**	0,35*	-0,52**	0,03	0,38**	0,33*	0,34*
Solubilidad	-0,33*	0,21	0,18	-0,24	-0,14	-0,65**	-0,15	-0,41**	-0,52**	-0,48**	-0,53**	0,45**	-0,27	-0,55**	-0,45**	-0,08
Color	-0,03	-0,88**	0,15	0,08	0,32*	0,40**	0,09	0,25	0,34*	0,04	0,09	-0,19	-0,27	-0,17	-0,22	0,09
Sabor ácido	0,08	0,15	0,06	0,36**	0,16	0,20	0,69**	0,17	0,09	-0,11	-0,09	-0,26	-0,30*	-0,23	-0,21	0,26
Sabor salado	0,11	-0,03	0,10	0,48**	0,22	0,24	0,73**	0,20	0,15	-0,09	-0,07	-0,19	-0,28*	-0,20	-0,19	0,17
Sabor amargo	0,18	-0,15	0,09	0,32*	0,28	0,23	0,48**	0,36*	0,13	-0,10	-0,31*	-0,04	-0,29*	-0,26	-0,19	0,05
Sabor dulce	0,07	0,20	0,02	-0,13	-0,22	-0,27	-0,38**	0,13	-0,38**	-0,02	0,07	0,26	0,15	0,09	0,07	-0,01
Picante	0,19	-0,27	0,07	0,43**	0,44**	0,45**	0,58**	0,47**	0,32*	-0,05	0,02	-0,46**	-0,30*	-0,14	-0,17	0,26
Astringente	0,28*	-0,14	-0,13	0,52**	0,28	0,59**	0,72**	0,41**	0,36*	0,22	0,08	-0,36**	-0,22	0,02	0,01	0,29*
Ardiente	0,27	-0,30*	0,03	0,42**	0,44**	0,48**	0,60**	0,51**	0,33*	0,00	-0,01	-0,36**	-0,23	-0,09	-0,11	0,17
Acre	0,14	-0,04	0,00	0,37**	0,24	0,35*	0,62**	0,38**	0,17	-0,02	-0,08	-0,20	-0,26	-0,13	-0,13	0,26
Persistencia	0,19	-0,28*	-0,09	0,57**	0,23	0,48**	0,63**	0,30*	0,32*	0,24	-0,19	-0,10	-0,19	-0,05	0,03	0,15
Impresión	-0,09	-0,43**	-0,06	0,20	0,08	0,20	0,12	0,24	0,28	0,22	-0,11	-0,05	-0,22	-0,15	-0,10	0,08

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

EFFECTO DE LA CATEGORÍA COMERCIAL Y DEL TIEMPO DE MADURACIÓN EN VACÍO SOBRE LA CALIDAD INSTRUMENTAL DEL LOMO DE RAZA DUROC

Álvarez-Rodríguez¹, J., Villagrasa, L., Ros-Freixedes, R., Gol, S., Henríquez, E., Pena, R., Estany, J. y Tor, M.

Departamento de Producción Animal. Universidad de Lleida. ¹ jalvarez@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La raza Duroc es ampliamente utilizada por su elevado engrasamiento, que favorece la aptitud tecnológica de la carne, pero empeora la clasificación comercial de las canales.

La maduración de la carne, mediante la exposición de las piezas al aire o mediante el envasado al vacío de cortes de la canal, pretende mejorar su terneza, sin repercutir negativamente sobre otros atributos como su color u oxidación lipídica. La maduración en vacío los primeros 2 días post-mortem reduce la dureza del lomo un 50%, y a los 4-6 días post-mortem se reduce entre el 80% y el 90% (Dransfield et al., 1980; Rees et al., 2002). En esos casos, la carne procedía de razas y/o cruces de líneas magras o intermedias.

Este trabajo se planteó para evaluar los efectos de la categoría comercial (R, 45-50% de magro; O, 40-45% de magro; o P, <40% de magro) y del tiempo de maduración en vacío (1, 3, 5 o 7 días) sobre el color, pérdidas de agua, dureza y estabilidad lipídica del lomo Duroc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 80 cerdos machos castrados de 210 días de edad, pertenecientes a una población de raza Duroc (Selección Batallé, Riudarenes, Girona), pertenecientes a 2 épocas de engorde cálidas (2013 y 2014, n=40 por lote, 8 cerdos/corral), y recibieron la misma dieta *ad libitum*. El pienso contenía 14% de proteína bruta, 6,4% de grasa bruta (58,8% de ácidos grasos monoinsaturados, AGMI; y 31,2% de ácidos grasos poliinsaturados, AGPI). Los cerdos se pesaron individualmente con 180 y 210 días de edad. Se calculó la ganancia media diaria de los mismos en el último mes de engorde. El día del sacrificio, los animales se sometieron a un período de ayuno <24 horas antes de su traslado al matadero (28 km de distancia). El tiempo de espera previo al sacrificio fue de 3 h en ambos lotes. Los cerdos fueron aturdidos con CO₂ (88%) (Butina ApS, Holbaek, Dinamarca), escaldados, depilados y eviscerados, partidos en dos medias canales, pesados y clasificados con un equipo normalizado AUTOFOM (SFK-Technology, Herlev, Dinamarca) que estima el porcentaje de magro a partir de medidas del espesor de grasa y músculo en distintos puntos de la canal mediante ultrasonidos. Las canales se clasificaron en R (45-50% de magro, n=18), O (40-45% de magro, n=28) o P (<40% de magro, n=34), según la clasificación oficial en España (BOE, 2011) y se orearon 20 horas a 2 °C. A continuación, se midió el pH del músculo *Longissimus dorsi* entre la 3ª y la 4ª costilla, antes del despiece de las canales. Se obtuvo una muestra de dicho músculo (4 cm lineales, 164±34 g), se envasó al vacío y se conservó en refrigeración hasta su llegada al laboratorio 3 h más tarde.

La muestra de lomo se seccionó en dos filetes, 1 cm para evaluar el color y 3 cm aproximadamente para evaluar la dureza y la oxidación lipídica en distintos tiempos post-mortem: día 1 (T1), 3 (T3), 5 (T5) y 7 (T7). Para ello, cada filete se dividió en 4 trozos homogéneos. El primero se dejó airear 1 h para medir por la cara interna las coordenadas de color (3 lecturas por muestra) según la escala CIELab con un espectrofotómetro (Konica Minolta CM-700d, Osaka, Japón). A continuación, esa muestra se utilizó para determinar las pérdidas de agua en tubos de centrifugación (Kristensen y Purslow, 2001). Así mismo, se determinó por cromatografía de gases la composición de ácidos grasos y el contenido de grasa intramuscular (GIM), estimado a partir de la suma total de los mismos expresados como equivalentes de triglicéridos (Bosch et al., 2009). Los otros tres trozos de cada filete se envasaron al vacío y se conservaron en refrigeración a 4 °C sin luz durante 3, 5 o 7 días post-mortem. Los trozos para medición del color se desensaron a los días 3, 5 y 7 post-mortem, mientras que los trozos para evaluar la dureza y la oxidación lipídica se congelaron a -20 °C después de su maduración correspondiente en vacío hasta su análisis conjunto.

Se midieron las pérdidas de agua por descongelación (24 h en refrigeración a 4 °C). Se estimó el contenido relativo de metamioglobina (MMb) a partir de las medidas objetivas de

color, calculando el ratio Kubelka–Munk $K/S_{572/525}$ (AMSA, 2012). La dureza del lomo se evaluó con una célula Warner Bratzler (5 kg de carga y velocidad de deformación de 2,5 mm/s) conectada a un texturómetro TA-TX2 (Stable Micro Systems Ltd, Surrey, Reino Unido). La oxidación lipídica se evaluó mediante el método TBARS, adaptando el método de Buege y Aust (1978). Las muestras (5 g) se homogeneizaron con 15 ml de agua destilada en tubos falcon de 50 ml. Se transfirió por duplicado 1 ml de homogeneizado a tubos de pyrex y se le añadieron 2 ml de una solución de ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0,375%) y HCl 1 N. Los tubos se agitaron en baño de agua a 90 °C durante 60 min y la absorbancia se midió a 540 nm por espectrofotometría. La curva de calibración se creó con concentraciones (0 a 100 µl) de malonaldehído (MDA) obtenido por hidrólisis de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en 100 ml de HCl 1 N. Los valores de TBARS se expresaron como mg de MDA por g de GIM.

Los datos se analizaron con el paquete estadístico Jmp Pro 11 (SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Los datos productivos, canal, pH, pérdidas de agua por centrifugación y composición de la GIM del lomo se analizaron con un modelo lineal general que incluyó la categoría comercial y el lote como efectos fijos. Los datos de color, pérdidas de agua por descongelación, dureza y TBARS se analizaron con un modelo lineal mixto que incluyó, además, el efecto del tiempo de maduración y su interacción con la categoría comercial. El resto de interacciones dobles se eliminaron del modelo porque resultaron no significativas ($P>0,05$). La separación de medias se realizó con un test t-Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados productivos de los cerdos Duroc se presentan en la Tabla 1. A pesar de que todos los animales tenían la misma edad de sacrificio (210 días), existieron diferencias en la ganancia media diaria de los grupos ($P<0,05$) que se tradujeron, a su vez, en diferencias en el estado de engrasamiento de la canal, sin que el rendimiento de la misma se viera afectado ($P>0,05$).

El pH del lomo y las pérdidas de agua por centrifugación a 24 h post-mortem no difirieron entre categorías comerciales ($5,91\pm 0,03$ y $1,84\pm 0,18\%$, respectivamente; $P>0,05$). Así mismo, ninguna coordenada de color CIELab difirió entre grupos ($P>0,05$). Asumiendo que la luminosidad (L^*) y la intensidad de color (C^*) son los parámetros que mejor representan la valoración visual subjetiva (Ripoll et al., 2012), L^* incrementó a partir del 5º día de maduración (46,7 vs. $49,9\pm 0,9$; $P<0,05$) y C^* incrementó a partir del 3r día (7,4 vs. $8,8\pm 0,4$; $P<0,05$). El contenido de MMb no difirió entre T1 y T5 ($K/S=1,30\pm 0,01$; $P>0,05$), pero incrementó significativamente en T7 ($K/S=1,28\pm 0,01$, $P<0,05$).

Las pérdidas de agua por descongelación fueron menores en T1 que en T7 ($20,1$ vs. $22,6\pm 0,7\%$; $P<0,05$), mientras que las maduraciones T3 y T5 mostraron pérdidas intermedias ($21,2$ vs. $21,3\pm 0,7\%$; $P>0,05$). La dureza y oxidación lipídica del lomo en las diferentes categorías comerciales y momentos de maduración se muestran en la Figura 1. A pesar de que el contenido de GIM se ha relacionado positivamente con la terneza del lomo (Jelenikova et al., 2008), la dureza fue similar en las 3 categorías comerciales en todos los tiempos de maduración excepto T7, donde la carne más magra presentó una resistencia al corte superior. En lomos de cerdo con moderado contenido de GIM (1,8-2,5%) y mayores esfuerzos máximos (5,0-4,3 kg), la maduración en vacío hasta 14 días aumentó linealmente la terneza (Channon et al., 2004; Juárez et al., 2009). El elevado contenido de GIM de la carne del presente trabajo podría haber atenuado la reducción de la dureza al aumentar el tiempo de maduración.

En todos los tiempos de maduración, especialmente a partir de T3, la oxidación lipídica (TBARS) fue superior en el lomo procedente de canales más magras (R) ($P<0,05$), lo que podría explicarse por su mayor contenido de AGPI. La aplicación de un tiempo de maduración de 7 días no produjo un deterioro notable de la carne, dado que para ello es necesario registrar valores de TBARS superiores a 1 mg MDA/kg de carne (Rossi et al., 2013). En nuestro caso, los resultados promedios fueron de $0,59\pm 0,02$ mg MDA/kg de carne. En estudios sensoriales con catadores entrenados, se requirieron maduraciones del lomo en vacío durante 14 días para reducir la calificación de algunos atributos de flavor y terneza (carne harinosa y blanda) (Juárez et al., 2009).

En resumen, las canales con mayor GIM mostraron un mayor contenido de AGMI y menor de AGPI, sin que se vieran afectados los AGS. La categoría comercial no afectó al color, pH

último o las pérdidas de agua de la carne. Excepto en las canales con mayor GIM envasadas 7 días al vacío, la maduración del lomo no redujo su dureza instrumental. La oxidación lipídica fue baja en todos los casos, especialmente en las carnes con más GIM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• AMSA, 2012. American Meat Sci. Assoc. • BOE, 2011. N°185 (I): 87921-87930 • Bosch, L., et al., 2009. Meat Sci. 82: 432-437 • Buege, J.A., Aust, S.D. 1978. Methods Enzymol. 52: 302-310 • Channon, H.A., et al., 2004. Meat Sci. 66: 881-888 • Dransfield, E., et al., 1980. Meat Sci. 5: 139-147 • Jelenikova, J., et al., 2008. Eur. Food Res. Technol. 227: 989-994 • Juárez et al., 2009. Meat Sci. 83: 447-453 • Kristensen, L., Purslow, P.P., 2001. Meat Sci. 58: 17-23 • Rees, M.P., et al., 2002. Meat Sci. 61: 169-179 • Ripoll, G., et al., 2012. Itea 108(2): 222-232 • Rossi et al., 2013. Meat Sci. 95: 542-548.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competividad (AGL2012-33529).

Tabla 1. Resultados productivos en vivo y de la canal, pH y composición de la grasa intramuscular del lomo de cerdos Duroc sacrificados a 210 días de edad

	R(45-50% magro)	O(40-45% magro)	P(<40% magro)	Valor P
Ganancia media diaria (g)	698±45a	806±36ab	839±34b	*
Peso sacrificio (kg)	126,9±2,3a	130,8±1,8a	138,9±1,7b	***
Rendimiento de canal (%)	75,9±0,4	75,6±0,3	76,3±0,3	NS
Magro de la canal (%)	46,6±0,5c	42,5±0,4b	35,7±0,4a	***
GIM (%)	3,18±0,25b	4,07±0,20a	4,32±0,19a	**
∑AGMI (%)	49,2±0,40a	50,17±0,32ab	50,88±0,30b	**
∑AGS (%)	39,14±0,45	40,32±0,36	40,21±0,34	NS
∑AGPI (%)	11,65±0,36a	9,51±0,29b	8,91±0,27b	***

GIM=grasa intramuscular; AGMI=ácidos grasos monoinsaturados; AGS=ácidos grasos saturados; AGPI=ácidos grasos poliinsaturados. ***=P<0,001; **=P<0,01; *=P<0,05; NS= no significativo P>0,05. Letra distinta en la misma fila indica diferencias significativas (P<0,05) entre categorías.

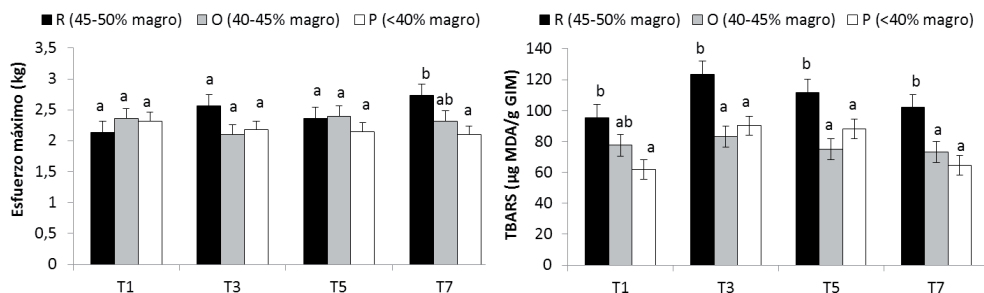


Figura 1. Efecto de la categoría comercial y el tiempo de maduración en vacío sobre el esfuerzo máximo y la oxidación lipídica (TBARS) del lomo de cerdo Duroc. Letra distinta en el mismo tiempo de maduración indica diferencias significativas (P<0,05) entre categorías.

EFFECT OF CARCASS GRADING AND AGEING TIME IN VACUUM ON THE TECHNOLOGICAL QUALITY OF PUREBRED DUROC PORK LOIN

ABSTRACT: Eighty purebred Duroc pigs slaughtered at 210 days of age were used to evaluate the effect of carcass grading (R, O and P) and ageing time (1, 3, 5, and 7 days) in vacuum on the technological meat quality of loin. The least lean carcasses (P grade) showed greater IMF and MUFA, without affecting the SFA content. Carcass grading did not influence meat colour, ultimate pH and drip loss. TBARS values were lower in the O and P carcasses, which also had less PUFA content. Vacuum ageing did not reduce shear force, except in O and P loins aged for 7 days.

Keywords: pigs, colour, texture, TBARS.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LA VIDA ÚTIL DE CHULETAS DE PIERNA DE TERNASCO ENVASADAS EN VACÍO “SKIN”

Bellés^{1*} M., Alonso¹, V., Calanche^{1,2}, J. B., Roncalés¹, P. y Beltrán^{1**}, J. A.

¹Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, España.

²Departamento de Tecnología de los Alimentos, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, República Bolivariana de Venezuela. *mbelles@unizar.es,

**jbeltran@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La carne de cordero es un producto altamente perecedero y cualquier método destinado a incrementar su vida útil es bien recibido (Scholtz *et al.*, 1992). Actualmente, la congelación es el método empleado para su conservación durante periodos prolongados, no obstante, las alteraciones que origina en el producto no han pasado desapercibidas para los consumidores. La refrigeración, en cambio, consigue minimizarlas. Habitualmente la temperatura de refrigeración para la carne de cordero es de 4 °C, sin embargo, temperaturas cercanas al punto de congelación incrementarían su vida útil. Combinado con la refrigeración, el envasado de los productos es fundamental en la conservación de los alimentos. El envasado a vacío tipo “skin” no es apto para la venta directa por el color rojo púrpura que toma la carne, pero podría ser utilizado para la venta mayorista. Este sistema de envasado consigue inhibir el crecimiento de microorganismos aerobios y además limita la oxidación (Lagerstedt *et al.*, 2011; Kamenik *et al.*, 2014). De acuerdo con esto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de conservación en la vida útil de chuletas de cordero envasadas a vacío tipo “skin”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las canales se eligieron al azar, provenientes de las calificadas dentro de la IGP Ternasco de Aragón en un mismo día de sacrificio. Posteriormente se refrigeraron durante 24 horas (-1,5 a 0,5 °C) y se seleccionaron dos piernas de cada canal. A continuación, fueron fileteadas y transportadas a la Planta Piloto de la Facultad de Veterinaria, donde se envasaron a vacío tipo “skin” (MULTIVAC R570 CD). Las muestras se dividieron en dos lotes y se almacenaron a 4 ± 0,5 °C y -1 ± 0,5 °C en oscuridad durante 28 días. Se midió el pH con un electrodo de punción, el color CIEL*a*b* y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Pfalzgraf *et al.* 1995). Para los análisis microbiológicos se realizó un recuento en placa. Las muestras se recogieron mediante hisopado en una superficie de 10 cm², para posteriormente realizar diluciones sucesivas en agua de peptona 0,1% (Biolife). Se sembró 1 ml empleando agar PCA (Merck) para Mesófilos y Psicrótrofos, VRBD (Merck) para *Enterobacteriaceae* y MRS (Merck) para bacterias ácido-lácticas. Los mesófilos y las enterobacterias se incubaron en aerobiosis a 37 °C, realizando el recuento a las 24 y 48 h, respectivamente. Las bacterias ácido-lácticas se incubaron en anaerobiosis durante 5 días a 37 °C. Para los psicrótrofos, las placas se incubaron a 10 °C, realizando el recuento a los 7 días. Las muestras utilizadas para el análisis sensorial fueron congeladas (-20 °C). Se cocinaron en un grill (Samill GRD10) a 200 °C hasta una temperatura interna de 72 °C. El análisis sensorial se realizó con un panel entrenado compuesto por 6 panelistas. Los atributos analizados (Intensidad de olor a cordero, intensidad de olor a rancio, terneza, jugosidad, flavor a cordero, a ácido y rancio y apreciación global) se puntuaron con una escala estructurada de 11 puntos. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el modelo lineal general del paquete estadístico SPSS y las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para pH, oxidación lipídica e índice de rojo (a*). La carne conservada a 4 °C presentó valores de pH significativamente menores que la mantenida a -1 °C. Estas diferencias pueden deberse a los mayores recuentos de bacterias ácido-lácticas en la carne refrigerada a 4 °C (Jeremiah y Gibson, 2001). Además, existieron diferencias entre los valores de pH en los distintos días para ambas temperaturas. La carne refrigerada a -1 °C presentó valores finales superiores al inicial, mientras que en la

mantenida a 4 °C los valores fueron inferiores. El descenso del pH en la carne conservada a 4 °C coincide con el observado por Constantino *et al.*, (2012) en carne de cordero envasado a vacío y refrigerada a 5 °C. Los valores de oxidación obtenidos a lo largo del periodo experimental fueron bajos en ambas temperaturas, coincidiendo con otros autores que no encontraron cantidades de malonaldehído superiores a 1 mg/kg de carne en cordero envasado a vacío (Fernandes *et al.*, 2014, Berruga *et al.*, 2005). Como ya señalo Kerry *et al.* (2000), el envasado a vacío es muy efectivo a la hora de controlar los procesos oxidativos, debido a la exclusión del oxígeno del interior del envase. No obstante, sí se apreció un aumento significativo de la cantidad de malonaldehído a lo largo del almacenamiento en ambas temperaturas, con una evolución similar a la encontrada por otros autores (Berruga *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2014). Tras un ligero aumento a lo largo de los primeros 14 días, la cantidad de malonaldehído permaneció constante. Esta ligera oxidación puede deberse a un pequeño residual de oxígeno en el interior del envase, suficiente para promover los fenómenos oxidativos (Smiddy *et al.*, 2002). También se observó una mayor oxidación para la carne conservada a 4 °C, que pudo estar favorecida por el mayor crecimiento microbiano. En relación al índice de rojo (a*), ambas temperaturas evidenciaron un buen mantenimiento de este parámetro. No obstante, la carne conservada a -1 °C presentó un color más rojizo que la que fue refrigerada a 4 °C. Estas diferencias se mantuvieron durante todo el periodo de conservación.

		Tiempo de conservación (días)						
		T (°C)	0	7	14	21	28	Sig
pH	-1		5,58±0,07 ^a	5,84±0,09 ^{bc}	5,74±0,07 ^b	5,89±0,19 ^c	5,82±0,16 ^{bc}	***
	4		5,63±0,12 ^c	5,59±0,04 ^c	5,67±0,14 ^c	5,46±0,06 ^b	5,29±0,15 ^a	***
	Sig		ns	***	ns	***	***	
mg MDA/Kg	-1		0,09±0,02 ^a	0,09±0,03 ^a	0,17±0,05 ^b	0,19±0,06 ^b	0,18±0,04 ^b	***
	4		0,09±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a	0,27±0,10 ^b	0,27±0,11 ^b	0,27±0,10 ^b	***
	Sig		ns	**	*	†	*	
a*	-1		11,83±1,60 ^a	14,23±1,71 ^{bc}	15,78±1,52 ^d	13,54±1,23 ^b	15,29±1,48 ^{cd}	***
	4		10,45±1,44 ^a	10,51±1,68 ^a	13,18±1,18 ^b	11,73±1,29 ^a	10,64±1,70 ^a	***
	Sig		ns	***	***	**	***	

Tabla 1. Medias y desviación estándar de algunos parámetros físico-químicos de la carne.

Valores en la misma fila con letra distinta (a, b, c, d) son significativamente diferentes. ns: $P > 0,05$; †: $P \leq 0,1$; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

Los resultados de los análisis microbiológicos pueden observarse en las figuras 1 y 2. Como puede comprobarse, se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de conservación para todos los microorganismos, siendo mayores los recuentos en la carne conservada a 4 °C. Estos resultados pueden explicarse por el efecto de la refrigeración sobre el crecimiento microbiano, que se ve reducido a medida que desciende la temperatura (Carballo y Jiménez, 2001). En la figura 1 puede observarse la existencia de un periodo de latencia de aproximadamente 1 semana para el crecimiento de los microorganismos mesófilos (-1 °C), este comportamiento no se ha descrito en la carne conservada a mayor temperatura. Para los psicrótrofos (Figura 2) pudo apreciarse un comportamiento similar, no obstante estos microorganismos alcanzaron recuentos mayores. El periodo de latencia descrito para estos microorganismos fue similar al observado por Fernandes *et al.* (2014), donde la carne se envasó a vacío y se refrigeró a 1 °C. Hay que destacar también los elevados recuentos de las bacterias ácido-lácticas, especialmente en la carne conservada a 4 °C, cuyo crecimiento podría haberse visto favorecido por la ausencia de oxígeno.

El análisis sensorial no mostró diferencias significativas entre las temperaturas de refrigeración. No obstante, sí que se apreció un efecto significativo del tiempo en los parámetros terneza, jugosidad y apreciación global, que obtuvieron mayores puntuaciones a medida que aumentaba el almacenamiento. Este comportamiento podría deberse a un aumento en la maduración de la carne, que no se detiene en el envasado a vacío. Este fenómeno ya se encuentra descrito en la bibliografía (Fernandes *et al.* 2014).

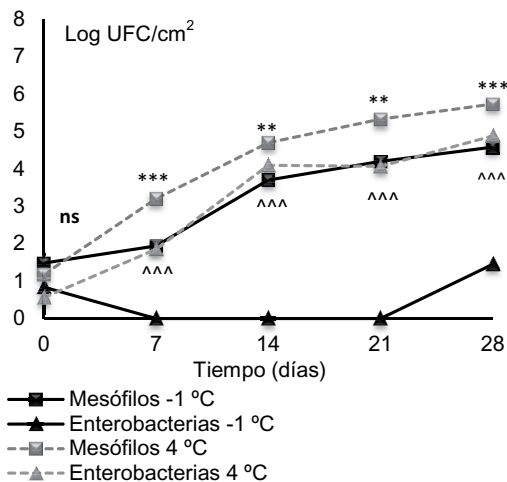


Figura 1. Mesófilos y Enterobacteriaceae

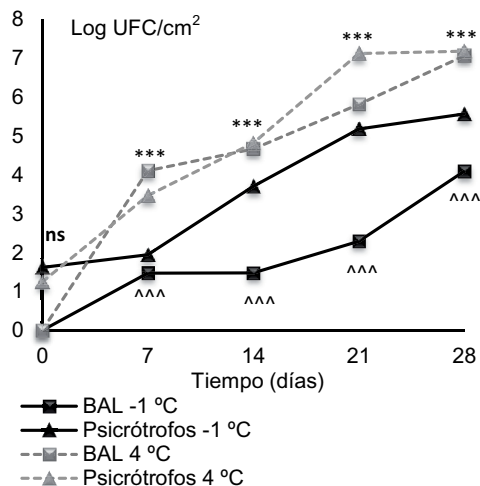


Figura 2. Bacterias Ácido Lácticas y Psicrótofos

ns: $P > 0,05$; */^: $P \leq 0,05$; **/^: $P \leq 0,01$; ***/^^: $P \leq 0,001$. *: Diferencias significativas para los Mesófilos/Bacterias Ácido Lácticas (BAL) en un mismo día, ^: Variaciones significativas para las Enterobacterias/Psicrótofos en un mismo día.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berruga, M.I. *et al.*, 2005. *Small Ruminant Res.* 57: 257-264.
- Carballo, J. y Jiménez, F. Capítulo 25: Refrigeración y congelación de la carne y los productos cárnicos, 475-509. S. Martín (Ed.), *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*, Vol I Martín y Macías. Madrid (España).
- Fernandes, R. *et al.*, 2014. *Meat Sci.* 96: 554-561.
- Jeremiah, L.E. y Gibson, L.L. 2001. *Food Res. Int.* 34: 815-826.
- Kamenik, J. *et al.*, 2014. *Eur. Food Res. Technol.* 239: 395-402.
- Kerry, J.P. *et al.*, 2000. *Meat Sci.* 56: 61-66.
- Lagerstedt, A. *et al.*, 2011. *Meat Sci.* 88, 391-396.
- Pzalgraf, A. *et al.*, 1995. *J. Agr. Food Chem.* 43: 1339-1342.
- Smiddy, M. *et al.*, 2002. *Meat Sci.* 61: 285-290.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración de la Cooperativa Casa Ganaderos y la empresa Franco y Navarro por facilitar las muestras.

EFFECT OF TEMPERATURE AND PRESERVATION TIME ON ORGANOLEPTIC PROPERTIES OF VACUUM “SKIN” PACKAGED LAMB CHOPS.

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the effect of temperature and preservation time on the stability of lamb chops vacuum skin packed. The chops were divided in two groups, then were vacuum packaged and chilled at -1 °C and 4 °C in darkness throughout 28 days. Colour, pH, lipid oxidation, microbiological (mesophilic viable counts, psychrotrophic viable counts, *Enterobacteriaceae* counts and Lactic Acid Bacteria counts) and sensory analyses were performed. The results obtained from physical and chemical analyses showed significant differences between temperatures. Regarding the red-green range, samples chilled at -1 °C showed higher a^* values than chops stored at 4 °C . On the other hand, pH values of chops maintained at 4 °C were lower than those chilled at -1 °C . For both chilling temperatures, lipid oxidation increased throughout the first fourteen days, and remained stable until the last day of storage. Related to microbiological analyses, samples stored at 4 °C showed higher counts for mesophilic, psychrotrophic, *Enterobacteriaceae* and Lactic Acid bacteria than those which were chilled at -1 °C . Sensory analyses did not found any differences among chilling temperatures.

Keywords: lamb meat microbiology, lipid oxidation, chilling.

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE HEMATOMAS EN LA EVOLUCIÓN DEL pH Y AMINAS BIÓGENICAS DE ACUERDO CON EL MÉTODO DE ENVASADO Y EL TIEMPO DE MADURACION EN CARNE VACUNA

Cruz-Monterrosa, R.G., Rayas-Amor, A.A. y Miranda-de la Lama, G.C.*
*Departamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, Av. Hidalgo Poniente 46, 52006, Lerma de Villada, Estado de México, México. *g.miranda@correo.ler.uam.mx*

INTRODUCCIÓN

Los hematomas constituyen una de las principales anomalías que afectan la calidad de la canal, pudiendo ser causa penalización o decomiso, además de ser un indicador importante de bienestar animal y un punto referencial en un programa de control de puntos críticos (Miranda-de la Lama *et al.*, 2014). Los hematomas pueden definirse como una decoloración focal de la superficie de la canal, causada por una colección extra-vascular de sangre, derivada de un trauma por el impacto. Es sabido que durante la maduración y almacenamiento pueden producirse cambios en el pH, color, textura y en las propiedades organolépticas del producto, además de un incremento en los niveles de aminas biogénicas. La presencia de las aminas biogénicas (AB) en la carne es el resultado de la descarboxilación enzimática de aminoácidos debido a enzimas microbianas y a la actividad de descomposición del tejido (Lorenzo *et al.*, 2007). En el vacuno se ha reportado a la histamina, la cadaverina y la putrescina como las aminas biogénicas más importantes, son termoestables y la exposición prolongada al calor no elimina su capacidad tóxica. Las AB han sido reportadas como un riesgo potencial para la salud humana, además de ser indicadores de la calidad y la frescura del producto. Si bien en gran cantidad de países económicamente preponderantes la gran presencia de hematomas en las canales es motivo de decomiso parciales y/o totales (Hoffman, y Luhl, 2012). En muchos países en desarrollo, los hematomas no suelen ser una razón de peso para el decomiso, por lo cual estas canales se destinan mayoritariamente al mercado local. Aunque en general, se acepta que los hematomas tienen un impacto negativo en la calidad de la carne y eventualmente en la inocuidad de la misma, no hay suficientes evidencias científicas que indiquen el comportamiento del pH y las concentraciones de aminas biogénicas bajo condiciones comerciales. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue evaluar la asociación de los hematomas con la evolución del pH y aminas biogénicas de acuerdo al método de empaque (bolsas de plástico vs empacado al vacío) y el tiempo de almacenamiento durante 21 días (muestreando los días 1, 7, 14 y 21 días) a 4 ° C.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Estado de México en los meses de septiembre del 2013 a abril de 2014. Las muestras se colectaron en un matadero privado situado en el municipio de "La Paz" (19 ° 21'38 "N, 98 ° 58'48" W), a 2260msnm. Se seleccionaron 50 canales de un total de 1.000 novillos comerciales (Pardo Suizo x Cebú) de 18 a 24 meses de edad y un peso vivo promedio de 450 ± 66 kg. Los animales fueron cebados en los estados de Querétaro, México y Morelos (centro de México). El tiempo de viaje promedio de los cebaderos al matadero fue de 3,5 ± 1,0 h. Las características de los camiones acoplados fueron: capacidad de 16 toneladas, con chasis de aluminio rígido de cinco compartimentos, ventilación pasiva y dos pisos. En el matadero los animales fueron aturdidos con un pistola de embolo oculto, para posteriormente ser desangrados y continuar en la línea, hasta la obtención de la canal. Las canales estuvieron 24 horas en las cámaras de oreo a 3° C. Donde se seleccionaron las canales con hematomas de severidad 2 (afecta el tejido subcutáneo y muscular), con un rango de color de: $L^* 26.34 \pm 5$, $a^* 15.12 \pm 5$ and $b^* 3.38 \pm 5$ (colorímetro modelo D25-PC2, Chroma Meter CR-200), con un tamaño de entre 8 y 16 cm localizados en el área del lomo ó pierna. Una vez elegido el hematoma, se procedía a tomar una muestra del tejido dañado (400 g) y otra de tejido sano adyacente (400 g). Todas las muestras se mantuvieron en bolsas estériles y trasladadas al laboratorio de carne sin romper la cadena de frío. En el laboratorio, cada muestra se dividió en cuatro piezas de 100 g y 2 cm de espesor y estas sub-muestras se almacenaron con dos métodos: BSH: muestra en bolsa de plástico sin hematomas; PWB: muestra en bolsa de plástico con

hematomas; VNB: muestra empacada al vacío sin hematomas; VWB: muestra empacada al vacío con hematomas. Todas las muestras fueron almacenadas a 4 ± 1 ° C (simulando las condiciones de venta en los supermercados en una cámara de refrigeración) durante 1, 7, 14 y 21 días. Esta cámara estaba iluminada por una lámpara fluorescente de supermercado estándar. Las muestras en la cámara se rotaron cada 24 h para minimizar las diferencias de intensidad de luz y las posibles variaciones de temperatura en la superficie de la carne de vacuno. El pH de todas las muestras se tomó a los días 1, 7, 14 y 21 post-mortem con un pH-metro (Hanna HI 99163, Hanna Instruments, EE.UU.). Antes de las mediciones, la sonda se calibró con soluciones tampón estándar de pH 4 y 7. La determinación de aminas biogénicas presentes en la carne se realizó de acuerdo al método reportado por Hwang y col. (1997). Cada muestra fue analizada por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue analizar la asociación de los hematomas con la presencia de aminas biogénicas y cambios de pH durante 21 días de maduración. Este estudio es uno de los primeros en demostrar la relación entre bienestar animal y la inocuidad del producto. La Tabla 1 muestra el incremento significativo ($P < 0.05$) de los valores medios de pH de manera paulatina en las muestras con hematomas, tanto para el tipo de empaque como a través de los días de maduración. Los hematomas son indicadores sensibles para detectar fallas en la cadena logística, porque ayudan a identificar la fuente de estas lesiones, como el uso y abuso del bastón eléctrico, golpes de operarios, mezcla social, salientes o puertas de guillotina. También se ha documentado que el transporte en caminos en mal estado y transportes largos, originan una mayor prevalencia de hematomas, debido a caídas y golpes entre los animales por la vibración. Asimismo, el incremento en el tiempo de espera pre-sacrificio también está asociado con los hematomas (Strappini *et al.*, 2010). En general, las muestras con hematomas (independientemente del tipo de empaque) tenían concentraciones de aminas biogénicas más altas en comparación con los tratamientos sin hematomas, durante los 21 días de maduración ($P < 0.05$). Las AB identificadas en este estudio fueron histamina, putrescina y cadaverina. En el caso de histamina, en el día 21 de maduración se obtuvieron las mayores concentraciones de histamina, en el grupo en bolsas plásticas con hematomas produciéndose 24.22 mg/Kg y en el grupo de empaque al vacío con hematomas 13.70 mg/Kg, deduciendo que la protección ante la proliferación de bacterias de la carne con hematoma se ve influenciada por el empaque al vacío, lo cual se supone que la falta de oxígeno disminuye el crecimiento de bacterias y por ende la descarboxilación de aminoácidos. Aunque se obtuvieron concentraciones bajas de putrescina cuando la carne bovina fue empacada al vacío de 1 a 21 días, se observó que aumentó tres veces la concentración de esta desde el primer día de maduración cuando la carne presentaba hematomas con/sin empaque al vacío y su incremento fue de más de 7 veces hasta los 21 días. El aumento de la producción de cadaverina en el grupo con hematomas se dio de 7 a 21 días, incrementando más de dos veces en comparación con los grupos sin hematomas, esta amina al igual que la putrescina podría estar relacionada con la presencia de enterobacterias que poseen enzimas descarboxilantes de lisina, debido a que estos microorganismos han sido reportados como los responsables de la producción de esta amina en productos cárnicos. Es posible que el impacto de los hematomas en la inocuidad de la carne haya sido subestimado en el pasado. Sin embargo, este trabajo contribuye a dar evidencias que indican la importancia de invertir en cambios operativos en el presente, para disminuir la incidencia de estas lesiones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hoffman, L. C., & Lühl, L. 2012. *Meat Science*, 92, 115–124
- Hwang, D.F., Chang, S.H., Shiua, C.Y. & Chai, T.J. 1997. *Journal of Chromatography B* 693:23–30.
- Miranda-de la Lama, G.C., Villarroel, M., & María, G.A. 2014. *Meat Science*, 98: 9–20.
- Lorenzo, J.M., Martínez, S, Franco, I., & Carballo, J. (2007). *Meat Science*, 77: 287–93.
- Strappini, A.C., Metz, J.H.M., Gallo, C.B., & Kemp, B. 2009. *Animal*, 3: 728–736.

Agradecimientos: Esta investigación fue financiada por PROMEP 103.5 / 13/6528 UAM-PTC-411 del R.G. Cruz -Monterrosa.

Tabla 1. Medias de mínimos cuadrados (\pm SE) de pH en carne fresca bajo diferentes tiempos de maduración.

Tratamientos	Días de maduración			
	1	7	1	21
BSH	5.59 \pm 0.04 ^{cC}	5.73 \pm 0.07 ^{cB}	5.75 \pm 0.11 ^{bCB}	5.84 \pm 0.09 ^{cA}
BCH	5.73 \pm 0.13 ^{aD}	5.85 \pm 0.04 ^{aC}	6.10 \pm 0.29 ^{aB}	6.32 \pm 0.24 ^{aA}
VSH	5.54 \pm 0.09 ^{dC}	5.57 \pm 0.03 ^{dB}	5.74 \pm 0.03 ^{cA}	5.75 \pm 0.05 ^{dA}
VCH	5.67 \pm 0.04 ^{bC}	5.77 \pm 0.04 ^{bC}	5.88 \pm 0.43 ^{bB}	6.06 \pm 0.15 ^{bA}

a,b,c,d: Letras minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa entre tratamientos ($P \leq 0,05$). A,B,C,D: Letras mayúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa entre días ($P \leq 0,05$).

Tabla 2. Medias de mínimos cuadrados (\pm SE) de aminos biogénicas carne fresca bajo diferentes tiempos de maduración.

Tratamientos	Días de maduración			
	1	7	14	21
Putrescina (mg/kg)				
BSH	1.78 \pm 0.27 ^{cC}	2.43 \pm 0.46 ^{cC}	11.85 \pm 1.34 ^{dB}	47.39 \pm 2.16 ^{cA}
BCH	5.27 \pm 0.44 ^{aD}	18.33 \pm 0.49 ^{bC}	51.19 \pm 3.34 ^{aB}	71.34 \pm 5.28 ^{aA}
VSH	0.65 \pm 0.13 ^{dD}	1.36 \pm 0.31 ^{dC}	2.74 \pm 0.20 ^{dB}	36.73 \pm 2.31 ^{dA}
VCH	3.58 \pm 0.16 ^{bD}	18.99 \pm 0.74 ^{aC}	36.73 \pm 1.95 ^{bB}	65.99 \pm 2.31 ^{bA}
Cadaverina (mg/kg)				
BSH	1.72 \pm 0.24 ^{bC}	2.03 \pm 0.33 ^{cC}	5.68 \pm 0.29 ^{cB}	27.28 \pm 2.17 ^{bA}
BCH	1.75 \pm 0.19 ^{bD}	4.42 \pm 0.39 ^{bC}	18.41 \pm 0.68 ^{aB}	46.36 \pm 2.56 ^{aA}
VSH	1.58 \pm 0.51 ^{cC}	1.49 \pm 0.33 ^{dC}	5.23 \pm 0.49 ^{dB}	10.30 \pm 0.58 ^{cA}
VCH	2.67 \pm 0.16 ^{aD}	5.44 \pm 0.38 ^{aC}	17.17 \pm 1.06 ^{bB}	46.18 \pm 2.76 ^{aA}
Histamina (mg/kg)				
BSH	0.28 \pm 0.17 ^{cC}	0.13 \pm 0.04 ^{dC}	2.67 \pm 0.43 ^{bB}	11.43 \pm 1.55 ^{cA}
BCH	0.69 \pm 0.24 ^{bD}	2.24 \pm 0.55 ^{aC}	3.29 \pm 0.47 ^{aB}	24.22 \pm 3.25 ^{aA}
VSH	0.32 \pm 0.22 ^{cD}	0.60 \pm 0.09 ^{cC}	1.93 \pm 0.10 ^{cB}	4.42 \pm 0.55 ^{dA}
VCH	0.99 \pm 0.08 ^{aC}	1.41 \pm 0.32 ^{bC}	1.97 \pm 0.46 ^{cB}	13.70 \pm 1.75 ^{bA}

a,b,c,d: Letras minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa entre tratamientos ($P \leq 0,05$). A,B,C,D: Letras mayúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa entre días ($P \leq 0,05$).

EFFECTS OF BRUISED BEEF WITH PH AND BIOGENIC AMINES EVOLUTION ACCORDING TO PACKAGING METHOD AND STORAGE TIME

ABSTRACT: The aim of the present study was assess the association of bruised beef with pH and biogenic amines evolution according to packaging method (plastic bag vs vacuum) and storage time for 21 days (sampling 1st, 7th, 14th and 21st day) at 4° C. The results showed that bruised meat favoured increments of biogenic amine concentrations, even more than non-bruised meat. The vacuum packed method limited the increments of biogenic amines (BA) concentrations during storage time therefore it improved shelf life of meat. The stress and bruises during pre-slaughter operations considerably reduce the quality and safety of meat. It is concluded that minimising bruises during pre-slaughter operations would reduce the economic losses of the carcass while maintaining the animal welfare and protection of consumers' health.

Keywords: Bruised meat; Biogenic amines; Meat safety; Animal welfare.

ANÁLISIS DE PREFERENCIAS DE LA CARNE DE OVINO ENVASADA AL VACÍO

Maza¹, M.T., Saied, M. y Gracia, A.

¹Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. *mazama@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El consumo de carne mantiene en nuestro país una tendencia decreciente, más acusada en el caso de la carne de ovino/caprino, con una disminución en el periodo 2012-2013 del 1,6% en la cantidad consumida y del 4,9% en términos de valor (MAGRAMA, 2013). La disminución del consumo influye negativamente sobre las ventas de este producto, especialmente en las estanterías de supermercados e hipermercados donde se vende la carne envasada. La poca rotación de estos productos se traduce en un aumento del desperdicio y la consiguiente pérdida de rentabilidad.

El envasado al vacío es el método más eficaz utilizado actualmente para prolongar la vida útil de las carnes crudas (Zhou *et al.*, 2010); sin embargo el éxito en el mercado dependerá del grado de aceptación que tenga por parte del consumidor (Siegrist, 2008).

El objetivo de este trabajo es medir el grado de aceptabilidad de los consumidores hacia el envasado al vacío de la carne fresca de ovino. En particular, se analizan las preferencias de los consumidores hacia diferentes atributos de la carne de ovino siendo el envasado al vacío una de esas características. Para ello se utiliza un experimento de elección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una encuesta a consumidores en la ciudad de Zaragoza mediante un cuestionario estructurado que incluía un experimento de elección. Con los datos obtenidos hemos caracterizado la muestra de consumidores desde un punto de vista sociodemográfico y teniendo en cuenta los hábitos de compra y consumo de carne de ovino que no expondremos en este trabajo.

Se entrevistó de forma personal a un total de 170 consumidores de carne de cordero en tres establecimientos de una cadena de distribución situados en distintos barrios de la ciudad de Zaragoza (Spain), con entornos socio-demográficos y económicos distintos, con el fin de aumentar la representatividad de la muestra. La encuesta se realizó durante las dos primeras semanas del mes de mayo de 2013 en el interior del establecimiento. Concretamente se efectuaron al lado del lineal de productos cárnicos envasados, ya que ello permitía colocar los productos a valorar en el estudio al lado de la gama de productos habituales, de modo que cuando tuviese lugar la tarea de elección del experimento, el encuestado pudiese visualizar los productos.

Las entrevistas fueron realizadas a distintas horas del día con la finalidad de abarcar todos los segmentos posibles de consumidores de carne de ovino.

El tiempo necesario para contestar el cuestionario y realizar la tarea de elección fue de unos 20 a 25 minutos. Conscientes del esfuerzo que debían realizar los entrevistados, se incentivó su participación con un pequeño obsequio.

Para seleccionar los atributos a incluir en el experimento de elección se llevaron a cabo varias reuniones con la empresa colaboradora tras las cuales se fijaron un conjunto de cinco atributos, presentes todos ellos de forma habitual en los productos cárnicos vendidos en los lineales de los supermercados. Estos atributos son: el tipo de pieza (filete de pierna deshuesada, chuletillo o jarrete); la marca (Marca del Distribuidor+Indicación Geográfica Protegida -MDD+IGP- o marca país de carne de cordero genérico de procedencia España); el envasado (envasado en atmósfera controlada o envasado al vacío), la etiqueta (etiqueta en "C", transparente de plástico o de papel) y el precio (6 €, 7,5 € y 9 €). En la fijación de los niveles de precio, se tomaron en consideración los precios de venta reales de la empresa; sin embargo, dado que el consumidor se fija más en el precio de la unidad que va a adquirir que en el precio por kg, se utilizó una bandeja con un peso único de 500 gramos, de este modo se aclaraba al encuestado que se trataba de precios por unidad vendida.

Para la determinación de los conjuntos de elección y bajo la premisa de intentar conseguir un equilibrio entre la eficiencia del modelo y el número de elecciones y alternativas a elegir por el encuestado, se decidió presentar en cada tarea de elección dos alternativas más la opción de no compra. De esta manera se evita que la elección lleve mucho tiempo y sea difícil, lo que podría influir negativamente en las respuestas de los entrevistados y degradar

la calidad de los datos. Con el planteamiento descrito, se diseñó el experimento de elección utilizando el Software Sawtooth Market Research Tools' (SMRT) obteniéndose un diseño con una eficiencia del 95% y 24 tareas de elección que se asignaron aleatoriamente en dos bloques, con lo que los entrevistados debían efectuar 12 tareas de elección. La función de utilidad general de cada consumidor se puede representar del siguiente modo:

$$U_{njt} = \beta_{0n} \text{Noelección}_{njt} + \beta_{1n} \text{Chuletila}_{njt} + \beta_{2n} \text{Filete}_{njt} + \beta_{3n} \text{Jarrete}_{njt} + \beta_{4n} \text{Bimarca}_{njt} + \beta_{5n} \text{Pais}_{njt} + \beta_{6n} \text{Atmosfera}_{njt} + \beta_{7n} \text{Vacío}_{njt} + \beta_{8n} \text{Papel}_{njt} + \beta_{9n} \text{Transparente}_{njt} + \beta_{10n} \text{PapelC}_{njt} + \beta_{11n} \text{PrecioBajo}_{njt} + \beta_{12n} \text{PrecioMedio}_{njt} + \beta_{13n} \text{PrecioAlto} + \xi_{njt}$$

Donde las variables correspondientes a los diferentes niveles de los atributos han sido definidas como variables efecto que toman el valor 1 si este nivel está presente y el -1 en cualquier otro caso. La variable Noelección es una variable dummy que toma el valor 1 para la alternativa de no compra por lo que se espera que su signo sea negativo lo que indica que los encuestados obtienen mayor utilidad si eligen las otras dos alternativas.

Esta función de utilidad ha sido especificada como un modelo Logit Multinomial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El modelo Logit Multinomial se estimó con el software Sawtooth donde cada uno de los parámetros estimados indica el efecto de cada nivel de los atributos en la utilidad del consumidor (Tabla 1). De esta manera cuanto mayor es el efecto del nivel en la utilidad más preferido es ese nivel. La tabla 1 muestra que los parámetros estimados son todos individualmente significativos salvo los correspondientes a los niveles del atributo etiqueta. Los parámetros de los precios disminuyen al aumentar el precio por lo que se cumple la teoría económica que establece una relación negativa entre la utilidad y el precio.

Tabla 1. Parámetros estimados del modelo logit condicional

Nivel del atributo	Estimación	Std Err	t-ratio
Chuletila	0,416	0,048	8,613
Filete	-0,073	0,045	-1,617
Jarrete	-0,343	0,048	-7,169
Bimarca	0,476	0,030	15,97
País	-0,476	0,030	-15,97
Atmósfera	-0,059	0,028	-2,069
Vacío	0,059	0,028	2,069
Papel	-0,014	0,048	-0,303
Transparente	-0,069	0,046	-1,497
PapelC	0,084	0,050	1,687
Precio B (6 €/kg)	0,133	0,046	2,897
Precio M (7,50 €/kg)	0,086	0,052	1,646
Precio A (9 €/kg)	-0,219	0,047	-4,650
Noelección	-1,754	0,095	-18,410
Logaritmo de Verosimilitud		-1332,669	

En la Tabla 1 se observa que para el atributo pieza, las chuletilas ofrecen al consumidor la utilidad más elevada por lo que se puede concluir que se trata de la pieza más atractiva para el consumidor. Para el atributo marca, la mayor utilidad se observa para el nivel Bimarca (MDD+IGP) y para el atributo envasado, para el envasado al vacío. Por el contrario en el caso de la etiqueta no podemos decir que existan diferencias significativas en cuanto a su preferencia.

Como el objetivo principal del estudio es analizar la aceptación del envasado al vacío, se han comparado las preferencias hacia este envasado entre los tres puntos de venta observándose que el envasado al vacío ha sido más preferido por los entrevistados en la tienda situada en un entorno socioeconómico más favorable.

Se han analizado también las diferencias en las preferencias de los consumidores hacia el envasado al vacío atendiendo a su frecuencia de compra y sus características sociodemográficas. Se ha obtenido que los encuestados que suelen comprar carne de cordero una vez o más de una vez a la semana (119 personas) se muestran más sensibles al envasado al vacío con una preferencia estadísticamente significativa superior hacia este tipo de envasado que los demás entrevistados. Este resultado indica que las personas que compran carne de cordero con más frecuencia son las más interesadas en el envasado al vacío, puesto que ello les permitiría no tener que comprar carne de ovino con tanta frecuencia.

Con respecto a las variables sociodemográficas se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la utilidad hacia el envasado al vacío para la presencia de hijos, el género y el nivel de formación. El envasado al vacío es preferido por mujeres con nivel de formación medio y que viven en hogares con hijos. Este último resultado coincide en parte con el obtenido en el estudio de Chen *et al.* (2013), en una ciudad canadiense, en el que la preferencia por la carne de vacuno envasada al vacío aumentaba con el nivel de educación e ingresos y con la presencia de niños en el hogar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chen, Q., Anders, S., & An, H. (2013). Measuring consumer resistance to a new food technology: A choice experiment in meat packaging. *Food Quality and Preference*, 28(2), 419-428.

MAGRAMA (2013). Últimos datos de consumo alimentario, 2012-2013.

Siegrist, M. (2008). Factors influencing public acceptance of innovative food technologies and products. *Trends in Food Science and Technology*, 19(11), 603-608.

Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat - A review. *Meat Science*, 86(1), 119-128.

ASSESSING CONSUMERS' PREFERENCES FOR VACUUM PACKAGING OF FRESH LAMB MEAT

ABSTRACT: Advanced packaging technologies offer new ways of protecting and extending the shelf life of the meat products. The vacuum packaging is an efficient way to increase fresh meat shelf life. However, consumers are often reluctant to accept new technologies. In this context, it is very important to understand consumers' acceptance for the vacuum packaging for lamb meat to help lamb meat producers to decide whether to use this new packaging. Then, the aim of this study is to analyse consumers' acceptability of vacuum packaging for fresh lamb meat. In particular, to assess consumers' preferences for different fresh lamb meat attributes including the vacuum packaging. To do that, a choice experiment was used. Data come from a survey administrated in Spain during 2013. A Multinomial Logit model was used to estimate the effect of the attributes-levels on consumers' utility. Results indicated that the vacuum packaging was more value for consumers than other types of packaging. Moreover, medium level education females living in households with children who purchase lamb meat one or more times per week shows higher preferences for vacuum packaging for lamb meat. Therefore, this group of consumers are more prone to accept this new packaging for lamb meat.

Keywords: vacuum packaging, lamb meat, choice experiment.

APARIENCIA, INFORMACIÓN SOBRE INGREDIENTES Y PRECIO EN LA DECISIÓN DE COMPRA DE JAMÓN COCIDO

Resconi^{1*}, V.C., Barahona¹, M., Keenan¹, D.F., Guerrero², L. y Hamill¹, R.M.

¹ Teagasc, Food Research Centre Ashtown, Dublin 15, Irlanda

² IRTA Monells, Finca Camps i Armet, E-17121 Monells, Spain
*virginiaresconi@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los consumidores europeos perciben la carne procesada como no saludable y con altas cantidades de químicos perjudiciales, grasa y sal (Haugaard *et al.*, 2014) es por ello que en el mercado se están ofreciendo alternativas más saludables, como por ejemplo productos con bajo contenido en sal. El almidón es un posible sustituto de un aditivo “químico” ampliamente utilizado en la industria cárnica, los fosfatos, ya que también puede retener agua e incluso podrían mejorar la textura y el sabor (Joly y Anderstein, 2009). Sin embargo, con el uso de almidón es posible que se forman geles visibles en el jamón cocido (Resconi *et al.*, 2013), de modo que se debería estudiar la aceptabilidad visual de ese nuevo producto. Según Haugaard *et al.* (2014), la industria debería considerar cambios en la apariencia lejos de lo que se percibe familiar para los consumidores, dado que un cambio visible podría generar confianza y ver que ese producto es diferente y creer que es más saludable, aunque por supuesto, el producto debería lucir apetitoso.

Otra opción es el agregado de compuestos percibidos como más saludables. La fibra alimentaria, por ejemplo, puede ser satisfactoriamente añadida en productos cárnicos (Fernández-Ginés *et al.*, 2005, Resconi *et al.*, 2013) y si se añade en cantidades suficientes, se podría incluir una etiqueta como “fuente de fibra”, por lo que sería interesante estudiar la respuesta de los consumidores a esas etiquetas. En productos lácteos como el yogur los consumidores suelen aceptar compuestos bioactivos, pero se sienten más inseguros en la aceptación de su uso en productos cárnicos (Tobin *et al.*, 2014). Es más, ciertos consumidores estarían dispuestos a comprar productos cárnicos funcionales, pero no a pagar más por ellos (Tobin *et al.*, 2014).

En este trabajo se evalúa la importancia relativa de la apariencia, el etiquetado sobre aditivos (sal, fosfatos, fibra) y el precio sobre las decisiones de compra de jamón cocido por los consumidores irlandeses. En Irlanda el jamón cocido es un producto habitualmente consumido y se podría considerar como un producto tradicional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 100 consumidores de jamón cocido, Irlandeses, residentes de la provincia de Leinster, mujeres y hombres de 20 a 64 años. El análisis conjunto basado en la elección (choice base conjoint analysis) fue diseñado y analizado estadísticamente con el *software* XLStat (version 2013.2.04), utilizando un diseño factorial cuarto con 12 perfiles, 10 comparaciones por consumidor (presentado al azar) y 2 opciones/tarjeta por comparación. Se estudiaron 5 factores con 2 o 3 niveles:

- Apariencia: imagen de loncha de jamón cocido preparado con ingredientes tradicionales (Imagen 1) o con el agregado de almidón y con geles de almidón visibles en la loncha (Imagen 2). Las imágenes se obtuvieron a través del escaneado (HPscanjet 5590, HP Photo & Imaging Gallery *software*, version 1.1) de las lonchas junto a una tarjeta de color graduada (QPcard 201). Los jamones fueron producidos en el centro de investigación (Teagasc, Food Research Centre) tal y como se describen en Resconi *et al.* (2013). Las imágenes fueron retocadas con Adobe Photoshop para que las lonchas tuvieran el mismo tamaño y forma, color y nivel de grasa externa.
- Etiquetado sobre fosfatos: “sin fosfatos añadidos”; “bajo en fosfatos”; sin etiqueta
- Etiquetado sobre fibra: “fuente de fibra”; sin etiqueta
- Etiquetado sobre sal: “bajo en sal”; sin etiqueta
- Precio: 1.79 €/100g; 1.99 €/100g

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis conjunto mostraron no sólo que los consumidores irlandeses prefieren lonchas de jamón sin geles de almidón visible (Figura 1), sino que la apariencia fue el atributo más importante en la decisión de compra en comparación a características

extrínsecas (etiquetado referido a los ingredientes y precio). La importancia relativa de los factores fue del siguiente modo: apariencia 38.2 %; etiquetado sobre fosfatos, 26.8 %; etiquetado sobre sal, 18.7 %; precio, 9.0 %; y finalmente, etiquetado referido a la fibra (7.3 %). En el estudio de González-Viñas *et al.* (2004), el aspecto de las salchichas fue también considerado el criterio más importante para consumidores españoles en el momento de la compra. En el presente trabajo en particular, el desconocimiento sobre qué causa esos geles visibles pudo haber afectado en las elecciones de los consumidores; similar conclusión fue descrita en el estudio de Cilla *et al.* (2006) sobre los puntos blancos en el jamón serrano.

El uso de la etiqueta “bajo en fosfatos” y especialmente “sin fosfatos añadidos” influyó positivamente en la compra simulada de jamón cocido (Figura 1). Por otro lado, en una situación de mercado otros atributos permaneciendo constantes, el hecho de no incluir información sobre la reducción o la exclusión de fosfatos si la competencia lo hace, podría afectar seriamente la elección de ese producto. Este aspecto es incluso más importante que la ausencia de información sobre una reducción de sal, a pesar de que los consumidores están generalmente al tanto de los efectos perjudiciales de dietas altas en sal/sodio (Kim *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, así como otros estudios han demostrado, los productos cárnicos con bajo contenido en sal/sodio son percibidos en general positivamente por consumidores europeos (Guàrdia *et al.*, 2006; Tobin *et al.*, 2014), especialmente por mujeres y no fumadores (Guàrdia *et al.*, 2006). No obstante, debe tenerse en cuenta que un etiquetado que notifica sobre una reducción de sal podría ser adverso para un grupo específico de consumidores motivados prioritariamente por características sensoriales.

Respecto al factor precio, el más caro fue el preferido, probablemente porque perciben al precio como un indicador de calidad, si bien fue uno de los factores menos importantes en el momento de decidir la compra simulada de jamón cocido (Figura 1). El precio presentó también un efecto positivo en la calidad esperada en un estudio de carne de vacuno (Bello *et al.*, 2000). En otro estudio, en que se consideraban las características importantes para los consumidores cuando compran jamón curado, la importancia del precio resultó mayor cuando respondieron los carniceros respecto a la importancia reconocida por los propios consumidores, lo que podría indicar de que los consumidores suelen ser reacios a manifestar la verdadera influencia del precio en sus elecciones de compra (Morales *et al.*, 2008).

Los autores no tienen conocimiento de la venta comercial de jamones cocidos con fibra alimentaria añadida actualmente. De modo que, si bien no estaban familiarizados con la inclusión de fibra en este producto, la idea fue percibida positivamente por los consumidores irlandeses, aunque la importancia fue menor respecto a los otros factores estudiados. Es por ello que la decisión de producir este novedoso y más saludable jamón debería ser analizado en profundidad. El uso de otros términos, como “enriquecido en oligosacáridos” u otra información sobre efectos fisiológicos o en la salud podrían ser más atractivos (Bech-Larsen *et al.*, 2001). El uso de un adjetivo apropiado en el etiquetado puede influenciar en gran medida la intención de compra (Kim *et al.*, 2012).

Este estudio demuestra que se deben seguir realizando esfuerzos para ofrecer al consumidor productos cárnicos con menor contenido de aditivos percibidos como negativos, tales como los fosfatos y la sal. Aunque en menor magnitud, los consumidores irlandeses también valoran positivamente la inclusión de ingredientes novedosos y saludables en el jamón cocido, como la fibra alimentaria. Sin embargo, debe tenerse en cuenta el efecto de las nuevas recetas sobre la apariencia, ya que puede afectar en gran medida sobre la decisión de compra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bech-Larsen, T., Grunert, K.G. & Poulsen, J.B. 2001. MAPP working paper no. 73 (pp. 32). Aarhus: The Aarhus School of Business.
- Bello Acebrón, L. & Calvo Dopico, D. 2000. *Food Qual. Prefer.* 11: 229-238.
- Cilla, I., Martínez, L., Guerrero, L., Guàrdia, M.D., Arnau, J., Altarriba, J. & Roncalés, P. 2006. *Food Sci. Technol. Int.* 12: 229-240.
- Fernández-Ginés, J.M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E. & Pérez-Alvarez, J.A. 2005. *J. Food Sci.* 70: R37-R43.
- González-Viñas, M.A., Caballero, A.B., Gallego, I. & García Ruiz, A.

2004. *Meat Sci.* 67: 633-641. • Guàrdia, M.D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P. & Arnau, J. 2006. *Meat Sci.* 73: 484-490. • Haugaard, P., Hansen, F., Jensen, M. & Grunert, K.G. 2014. *Meat Sci.* 96: 126-135. • Joly, G. & Anderstein, B. 2009. En R. Tarté (Ed.), *Ingredients in Meat Products* (pp. 25-55): Springer New York. • Kim, M.K., Lopetcharat, K., Gerard, P.D. & Drake, M.A. 2012. *J. Food Sci.* 77: S307-S313. • Morales, R., Guerrero, L., Claret, A., Guàrdia, M. D. & Gou, P. 2008. *Meat Sci.* 80: 1005-1012. • Resconi, V.C., Keenan, D.F., Gough, S., Doran, L., Allen, P.A., Kerry, J.P.; Hamill, R.M. En: *ICoMST 2013 E-Book of Proceedings*. 0-37. • Tobin, B.D., O'Sullivan, M.G., Hamill, R. & Kerry, J.P. 2014. *Meat Sci.* 97: 207-213.

Agradecimientos: El experimento fue financiado por *Food Institutional Research Measure (08/RD/TAFRC/671)* del *Department of Agriculture, Food and the Marine*, Irlanda. Se agradece a Sergi Real Vidal por el diseño de las tarjetas para el análisis conjunto y la participación de los consumidores.

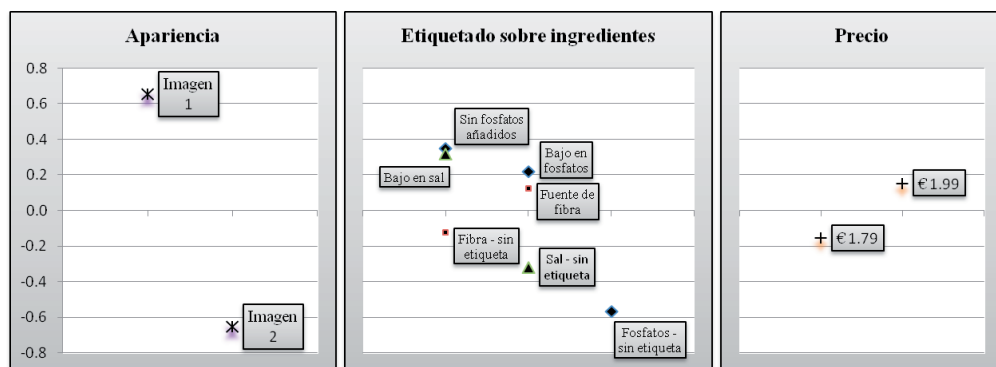


Figura 1. Utilidades para cada nivel de los factores estudiados en el análisis conjunto que indican la importancia relativa dada por los consumidores irlandeses al comprar jamón cocido

APPEARANCE, INGREDIENTS LABEL AND PRICE IN PURCHASING DECISIONS OF COOKED HAM

ABSTRACT: The aim of the study was to evaluate the relative importance of appearance (ham images with/without starch gel pockets), ingredients labels (regarding the use of phosphates, salt and fibre) and price cues in simulated purchasing decisions of cooked hams, using a choice base conjoint analysis with 100 Irish consumers. The results had shown that consumers prefer not to choose hams with gel pockets and that this visual aspect was more important compared to labels regarding the use of additives and price. The labels “low in phosphates”, “no added phosphates” or “low in salt” positively influenced choices. In a market situation, the fact of not including labels about a reduction or an exclusion of phosphates, if the competence does, could strongly affect consumer choices, and even more than absence of labels regarding a reduction of salt addition. The inclusion of a label “contains dietary fibre” in cooked ham was perceived positively by Irish consumers, but was the least important factor. Finally, the more expensive hams were preferred. This study shows that Irish consumers are willing to buy novel and healthier meat products, but the possible effects of the new recipes over the appearance needs to be considered.

Keywords: *conjoint analysis, appearance, additives, consumers, cooked ham*

EFFECTO DE LA DIETA, ENVASE Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE LA APRECIACIÓN VISUAL Y LA INTENCIÓN DE COMPRA DE LA CARNE DE CERDO DE TERUEL CON I.G.P.

Panea*, B., Ripoll, G. y Albertí, P.

Unidad de Tecnología en Producción Animal. CITA de Aragón. Avda. Montañana, 930, 50.059 *bpanea@aragon.es

INTRODUCCIÓN

Los consumidores quieren productos seguros y de calidad. Para garantizar la seguridad alimentaria es necesario controlar las zoonosis, entre las que destaca la salmonelosis. España tiene una prevalencia de salmonelosis muy por encima de la media europea (EFSA, 2008). Algunos extractos derivados de plantas (EDP) poseen propiedades antimicrobianas (Peñalver *et al.*, 2005), por lo que se han propuesto como aditivos en pienso para controlar la infección por *Salmonella* spp. Además, estos EDP combaten la oxidación de los lípidos de la carne (Botsoglou *et al.*, 2002), pero deben estudiarse las consecuencias de su uso como aditivos, ya que la dieta de los animales afecta a la calidad de su carne (Andersen *et al.*, 2005). Por otra parte, el envasado de la carne es fundamental para asegurar que llega al consumidor en buenas condiciones. El color es el atributo más importante que utilizan los consumidores para evaluar la calidad de la carne y afecta a la percepción de frescura y a la decisión de compra (Barbut, 2001). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la inclusión de EDP, tipo de envasado y tiempo de exposición al oxígeno sobre la apreciación visual de la carne fresca de cerdo y la intención de compra por parte del consumidor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 machos y 36 hembras, en tres lotes: **control** (pienso comercial), **aceites esenciales** (pienso + mezcla de carvacrol, timol, aldehído cinámico y eugenol; 2 Kg/Tm de pienso. Molimen, Barcelona) y **ajo** (pienso+ propil propano tiosulfonato + propil propano tiosulfonato; 0,5 kg/Tm de pienso; Domca, S.A., Granada). Los animales se sacrificaron al alcanzar las condiciones del pliego de la IGP (animales cuyo peso canal caliente sea mayor de 80 Kg. y que presenten un espesor de tocino dorsal en el pernil superior a 10 mm). De cada animal, se obtuvieron 3 filetes de 2 cm de espesor del lomo izquierdo, que se envasaron como sigue: 1. **film**: bandeja de poliexpán con film permeable al oxígeno 2. **map**: bandeja de polietileno y atmósfera protectora (MAP) (70% O₂, 30% CO₂). 3. **vacío**: vacío hasta el 4º día post-mortem, desembolsado y bandeja de poliexpán con film. Todas las muestras se colocaron en una vitrina expositora de tipo isla para simular las condiciones de compra en un supermercado. Los consumidores debían evaluar la carne por su aspecto en una escala de 1 (muy malo) a 10 (muy bueno) e indicar si la comprarían o no (intención de compra). Se obtuvieron un total de 1040 juicios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra estuvo uniformemente repartida por género (58% de mujeres), pero no por edad ($\leq 25=6,5\%$; $26-40=28,5\%$; $41-55=47,0\%$, $>55=33,0\%$). La nota aumenta con la edad del encuestado ($p=0,022$), pero sólo hay diferencias estadísticas entre los grupos extremos ($\leq 25=5,8$; $>55=6,3$). Las mujeres dan notas más altas que los hombres ($p=0,000$). Según Kubberod *et al.* (2002), los hombres muestran una variabilidad menor en la valoración sensorial pero otros estudios demuestran que la apreciación visual de la carne no guarda relación con las variables socio-demográficas (Verbeke *et al.*, 2005; Font i Furniols *et al.*, 2012). El lote control obtuvo notas más altas que los otros ($p=0,005$; Figura 1), coincidiendo con los estudios que demuestran que la adición de extractos de plantas no afecta al color de la carne (Simitzis *et al.*, 2010). No hubo diferencias entre machos y hembras pero sí una tendencia ($p=0,051$) y es posible que con un mayor número de animales se hubieran encontrado diferencias estadísticas. Algunos autores describen que no hay diferencias entre sexos para el color de la carne (Serrano *et al.*, 2008; Simitzis *et al.*, 2010), pero otros muestran ligeras diferencias (Newcom *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2009). La carne en MAP obtuvo notas más altas ($p=0,000$). Li *et al.* (2012), demostraron que el color es más estable en los envases con poco oxígeno pero es posible que, en el presente experimento, los

cambios ocurridos en la mioglobina durante el tiempo que la carne estuvo al vacío no se hayan revertido completamente al re-ensasar esta carne con film. Las notas bajan conforme aumenta el tiempo de exposición ($p=0,000$), pero se mantienen por encima del 5 incluso después de 10 días. Hay interacciones entre dieta y envase ($p=0,011$), entre dieta y tiempo ($P=0,004$) y entre envase y tiempo ($p=0,000$). Las notas de la carne en vacío fluctúan menos a lo largo del tiempo que las demás y las dadas al lote con aceites esenciales se movieron en un rango más estrecho que el resto (Figura 1). En cuanto a la intención de compra, independientemente del lote y envase, la mayoría de la gente sí compraría la carne (62,6%). El sexo del cerdo no afectó a la intención de compra. El porcentaje de SI compraría es menor en el lote aceite y el porcentaje de NO compraría es mayor en el film. Los porcentajes dependen del tiempo de exposición, pero desaparecen a partir del día 8. Los atributos más importantes para el consumidor son el color, la cantidad de grasa y la cantidad de agua en la superficie de la carne (Glitsch, 2000; Font i Furniols *et al.*, 2012). Ngapo *et al.* (2003) realizaron un estudio en varios países europeos sobre la percepción que tiene el consumidor de la carne porcina y encontraron que el color, el aspecto y la apariencia de fresca se revelaron como los más importantes. El color sufre variaciones a lo largo del periodo de conservación, debidos sobre todo a los cambios en la concentración de cada pigmento y a la oxidación (De Smet *et al.*, 2008). En las condiciones del presente experimento, podemos concluir que la dieta fue más importante que el envase o el sexo en la valoración visual de la carne de cerdo por parte de los consumidores. Independientemente de la dieta y envase, las notas se mantuvieron como aceptables a lo largo de todo el tiempo de exposición, por lo que la mayoría de los consumidores compraría cualquiera de las carnes expuestas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, H.J. *et al.*, (2005). *Liv. Prod. Sci.* 94, 105-124.
- Alonso, V. *et al.* (2009). *Meat Sci.* 81, 209-217.
- Barbut, S. (2001). *Meat Sci.* 59, 187-191.
- Botsoglou, N.A. *et al.* (2002). *Meat Sci.*, 62, 259-265.
- De Smet, K. *et al.* (2008). *Poultry Sci.*, 87, 1682-1688.
- EFSA. 2008. *EFSA J* 135: 1-111.
- Font i Furniols, M. *et al.* (2012). *Meat Sci.* 91, 448-453.
- Glitsch, K. (2000). *British Food J.* 102, 177-194.
- Kubberod, E. *et al.*, (2002). *Food Qual. Pref.* 13, 285-294.
- Li, X. *et al.* (2012). *Meat Sci.* 92, 604-609.
- Newcom, D.W. *et al.* (2004), *J. of Anim. Sci.* 82, 2264-2268.
- Ngapo, T.M. *et al.* (2003). *Meat Sci.* 66, 125-134.
- Peñalver *et al.*, 2005. *APMIS* 113:1-6.
- Serrano, M.P. *et al.*, (2008). *Meat Sci.* 78, 420-428.
- Simitzis, P.E. *et al.*, (2010). *Meat Sci.* 84, 670-676.
- Verbeke, W. *et al.* (2005). *Meat Sci.* 69, 343-354

Agradecimientos: Proyecto financiado con cargo al plan FITE. Agradecemos a Raúl Mainar y Sara Andrés que nos hayan proporcionado la carne para el experimento.

EFFECT OF DIET, PACKAGING AND EXPOSURE TIME ON VISUAL APPRAISAL AND PURCHASE INTENTION OF PORK FROM I.G.P. CERDO DE TERUEL

ABSTRACT: We studied the influence of the inclusion of additives derived from plants (garlic and essential oils), type of packaging (film, MAP or vacuum) and time of exposure to oxygen (from 3 to 10 days) on the visual appraisal of the fresh pork and purchase intention by the consumer. A total 1040 trials were obtained. The batch control obtained higher scores than the other two. There were no differences by consumer gender. Meat packaged in modified atmosphere obtained higher scores than the rest. The scores decrease as it increases the exposure time but remain above the 5 even after 10 days. There are interactions between diet and packaging, diet and time and packaging and time. Higher the age of the consumer, higher the scores. Women give higher scores than men. Regardless of the diet, most of the people would buy the meat, but the percentage is lower in oil lot. Pig sex did not affect the intent to purchase. There are differences between the percentages of YES and NO in lots of vacuum and MAP, but not in the film. Exposure time affects the percentage of YES and NO, but only until the 8th day of exposure.

Keywords: visual appraisal, purchase intention, packaging, diet

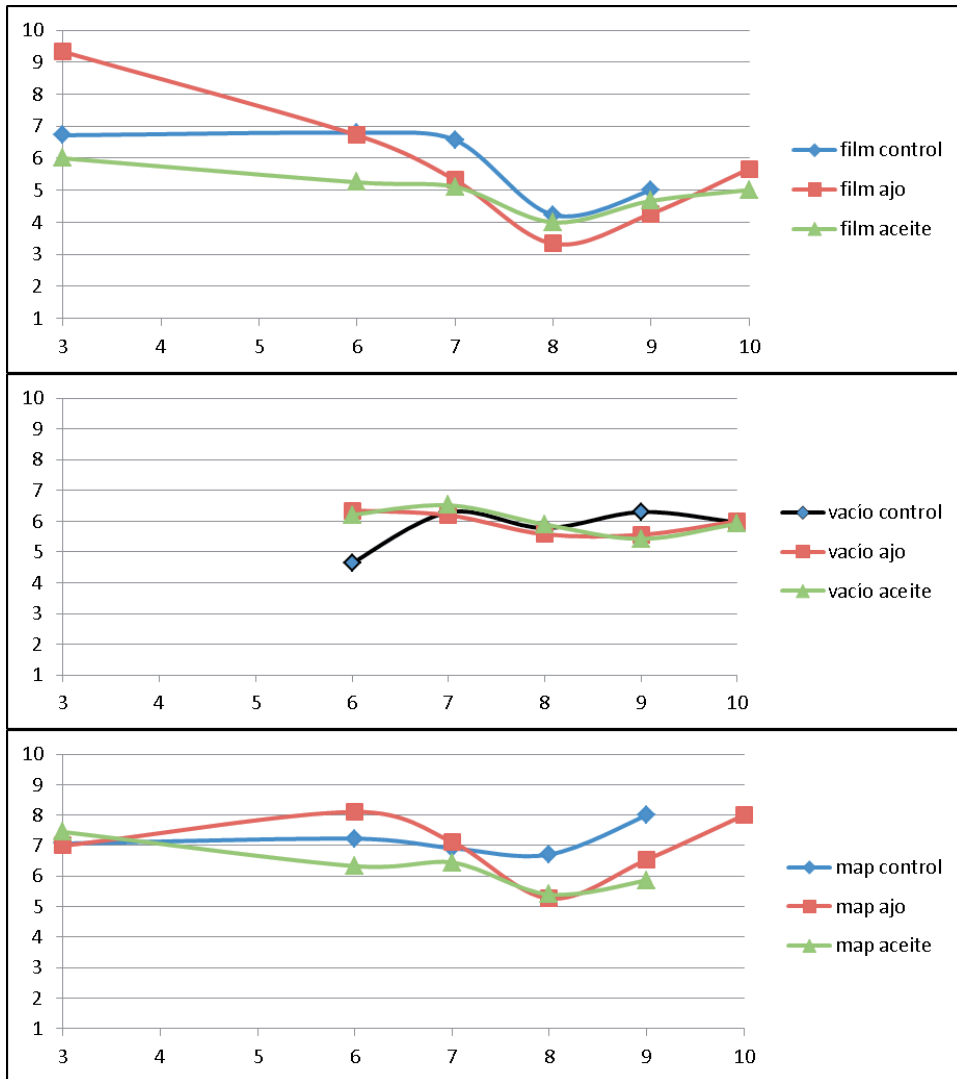


Figura 1. Evolución de la nota (ordenadas), a lo largo del tiempo (abscisas), en función de la dieta y el envase.

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE OLEÍNA DE GIRASOL EN LA DIETA DE EN CORDEROS EN FASE DE CRECIMIENTO-CEBO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA CARNE

Blanco¹, C., Giráldez¹, F.J., Andrés¹, S., Morán¹, L., Tejido¹, M.L., López¹, S. y Bodas², R.

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). Finca Marzanas. 24346 Grulleros, León.

²Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL). Finca Zamadueñas. 47071. Valladolid. *carolina.bf@eae.csic.es

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la composición de la grasa de la carne de cordero se ve afectada por la dieta (Demirel *et al.*, 2004; Nute *et al.*, 2007), siendo la inclusión de aceites de origen vegetal en la misma una de las estrategias más utilizadas para este fin (Castro *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2014; Manso *et al.*, 2009). Sin embargo, la utilización de estos aceites implica una competencia entre humanos y animales por los mismos recursos, por lo que el uso de subproductos de la industria aceitera, con propiedades similares al aceite pero no destinados al consumo humano, podría ser una alternativa adecuada, además de contribuir a su reciclado. Las oleínas son un subproducto del refinado de aceites vegetales con un perfil lipídico muy similar al aceite vegetal que se genera en el proceso (Abel-Caines *et al.*, 1998) y suelen tener un menor precio en el mercado. En lo que concierne al cebo de corderos, existe muy poca información científica sobre el empleo de estos subproductos en su alimentación y su efecto sobre la calidad de la carne. Por ello se ha planteado el presente trabajo, cuyo objetivo ha sido estudiar el efecto de la incorporación de distintas proporciones de oleína de girasol en la dieta de corderos sobre el perfil de ácidos grasos de la carne.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 32 corderos de raza merina, con un peso vivo inicial de $15,6 \pm 0,21$ kg, que fueron alojados en jaulas individuales. Los animales se distribuyeron en 4 grupos experimentales en función de la proporción de oleína de girasol (OG) incluida en la dieta: ración completa sin oleína (grupo control) o con diferentes proporciones de ésta (15; 30 y 60 g/kg para los grupos OG15, OG30 y OG60, respectivamente). Los ingredientes y la composición química de las raciones aparecen recogidos en la Tabla 1. Los animales fueron alimentados *ad libitum* y dispusieron de agua fresca a voluntad durante todo el periodo de cebo. Los animales fueron sacrificados al alcanzar los 27 kg de peso y, tras 24 horas de oreo de la canal a 4°C, se extrajo el músculo *longissimus thoracis* (LT), tomándose una muestra que se almacenó a -30 ° C. Posteriormente se liofilizó y se pesó, realizando la extracción y el análisis de ácidos grasos según la metodología descrita por Aldai *et al.*, (2012). El índice de aterogenicidad y el índice de saturación se calcularon de acuerdo con la metodología descrita por Ulbricht y Southgate (1991).

Índice de saturación (S/P) = $(C14 + C16 + C18)/(\sum MUFA + \sum PUFA)$

Índice de aterogenicidad (AI) = $(C12 + 4 \times C14 + C16)/(\sum MUFA + \sum n-6 + \sum n-3)$

Todos los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía, con la dieta recibida como fuente de variación, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se muestran los valores medios del contenido de los distintos grupos de ácidos grasos para cada dieta experimental. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) atribuibles a la dieta experimental en los contenidos de ácidos grasos totales, saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Se observó, sin embargo, una

tendencia a aumentar ($P < 0,10$) el contenido de ácidos grasos monoinsaturados *trans* (*trans*-MUFA) a medida que lo hizo el contenido de oleína de girasol en la dieta.

Este incremento observado en el contenido de los *trans*-MUFA fue debido principalmente a un aumento en el ácido 10t-18:1 (80, 117, 116 y 130 mg/100 g de carne fresca para los grupos control, OG15, OG30 y OG60, respectivamente). El incremento de este ácido está asociado al consumo de dietas de elevado contenido energético, con altas proporciones en concentrado, siendo más acusado con la incorporación de suplementos lipídicos en la misma (Bessa *et al.*, 2005). Son varios los autores que han observado este aumento con el uso de aceites vegetales (palma y soja) en dietas de cebo de corderos (Bessa *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista de la salud humana, el aumento en el contenido del ácido 10t-18:1, se considera negativo, ya que, en modelos animales, se ha observado que incrementa la aterogenicidad (Bauchart *et al.*, 2007). No obstante, este efecto negativo puede ser contrarrestado con cambios en el contenido de ácidos grasos insaturados con efectos beneficiosos contra el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Williams, 2000). De hecho en el presente estudio, cabe destacar que la inclusión de oleína mejoró tanto el índice de saturación como el de aterogenicidad, por lo que el incremento en los *trans*-MUFA podría no ser relevante desde el punto de vista de la salud humana.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la utilización de oleína de girasol en la dieta de corderos de cebo puede mejorar algunos índices nutricionales de la carne, tales como, el índice de saturación y el de aterogenicidad, relevantes desde el punto de vista de la salud de los consumidores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel-Caines *et al.*, 1998. J. Dairy Sci. 81:462-470 • Aldai *et al.*, 2012. Meat Sci., 92:687-696 • Bauchart *et al.*, 2007. Lipids, 42:123-133 • Bessa *et al.*, 2005. Livest. Prod. Sci., 96:185-194 • Castro *et al.*, 2005. Meat Sci., 69:757-764. • Demirel *et al.*, 2004. Br. J. Nutr, 91:551-565. • Ferreira *et al.*, 2014. Anim. Feed Sci. Technol 187:9-18. • Manso *et al.*, 2009. Meat Sci. 83:511-516. • Nute *et al.*, 2007. Meat Sci. 77:547-555. • Ulbricht & Southgate, 1991. Lancet, 338:985-992. • Williams, 2000. Ann. Zootech., 49:165-180.

Agradecimientos: Proyecto CICYT (AGL2010-19094).

Tabla 1. Ingredientes y composición química de los piensos experimentales.

	Control	OG15	OG30	OG60
Ingredientes (g/kg)				
Cebada	433	417	404	375
Maíz	150	145	140	130
Soja 44	237	243	246	255
Paja de cebada	150	150	150	150
Oleína de girasol	--	15	30	60
Corrector vitamínico/mineral	30	30	30	30
Composición química (g/kg MS)				
Materia seca (g/kg)	900	896	897	897
Fibra neutro detergente	227	219	218	212
Fibra ácido detergente	121	117	117	110
Proteína bruta	174	178	178	182
Extracto etéreo	30	41	56	70
Cenizas	68	69	67	72

Tabla 2. Contenido del valor medio de ácidos grasos (mg por 100 g de carne) y de diferentes índices nutricionales de interés en el músculo longissimus thoracis de corderos alimentados con raciones con diferentes porcentajes de oleína de girasol (0, 1,5, 3,0 y 6,0% grupos Control, OG15, OG30 y OG60, respectivamente).

Ácidos grasos (mg 100 g ⁻¹ carne)	Control	OG15	OG30	OG60	EED	P-value
TFA	2350	2469	2383	2543	354,0	0,948
SFA	1083	1023	983	1060	152,5	0,920
MUFA	910	1063	1050	1076	176,0	0,788
<i>cis</i> -MUFA	781	895	871	864	118,5	0,919
<i>trans</i> -MUFA	119	168	179	202	29,9	0,093
PUFA	273	301	260	295	22,6	0,315
n-6 PUFA	189	210	173	213	18,62	0,162
n-3 PUFA	30,2	29,8	29,8	28,5	3,23	0,945
CLA	14,1	15,5	14,3	16,2	1,21	0,797
Índices nutricionales						
n-6/n-3 PUFA	6,46	7,10	6,29	7,56	0,564	0,110
PUFA/SFA	0,271	0,288	0,240	0,272	0,025	0,496
AI	0,944	0,644	0,641	0,651	0,122	0,062
S/P	0,943	0,686	0,684	0,704	0,106	0,068

EED: Error estándar de la diferencia. P=nivel de significación: ns, P>0,10; t, P<0,10; *, P<0,05.

TFA: Ácidos grasos totales; SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; CLA, ácido linoleico conjugado; n-6, ácidos grasos n-6; n-3, ácidos grasos n-3; AI, índice de aterogenicidad; S/P, índice de saturación.

SUNFLOWER SOAPSTOCKS IN DIET FOR LIGHT FATTENING LAMBS: EFFECTS ON THE PROFILE MEAT FATTY ACIDS

ABSTRACT: Thirty-two Merino lambs (15.6 kg initial body weight, BW) were distributed in 4 experimental groups to study the effect of the inclusion of different levels of sunflower soapstock (SS) in the diet (0, 15, 30 and 60 g SS/kg TMR for Control, OG15, OG30 and OG60 groups, respectively) on the main fatty acids of their meat. Lambs were slaughtered at 27 kg BW, and *longissimus lumborum* muscles were extracted for fatty acid analysis.

No significant differences were observed in most groups of fatty acids (P>0.05). In contrast, *trans*-MUFA content tended to be higher in response to SS inclusion (P<0.10). Atherogenic index and saturation index tended to decrease with SS inclusion in the diet (P<0.10).

The inclusion of sunflower soapstock in the diet for fattening lambs can slightly improve lamb meat fatty acid profile.

Keywords: lamb, soapstock, meat quality, fatty acids

LOS NIVELES DE ÁCIDO RUMÉNICO Y ÁCIDO VACÉNICO DE LA GRASA INTRAMUSCULAR DE LOS LECHAZOS AUMENTAN AL INCORPORAR ORUJO DE UVA EN LA RACIÓN DE LAS OVEJAS

Guerra-Rivas, C., Gallardo, B., Lavín, P., Mantecón, A.R., Vieira, C. y Manso*, T.
Área de Producción Animal. Dpto. Ciencias Agroforestales. ETS Ingenierías Agrarias.
Universidad de Valladolid. 34004 Palencia.
*tmanso@agro.uva.es

INTRODUCCIÓN

Algunos autores han observado que la ingestión de compuestos fenólicos afecta a los procesos de biohidrogenación de los ácidos grasos a nivel ruminal y ha sido sugerida como estrategia de alimentación para mejorar la calidad nutricional y funcional de la grasa de la carne y de la leche de pequeños rumiantes (Priolo *et al.* 2000; Nieto, 2013).

Así, la inclusión de algunos polifenoles en la dieta de rumiantes, entre los que se encuentran los taninos condensados (TC), favorece la acumulación en los productos animales de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en general y en particular de algunos ácidos grasos bioactivos asociados con efectos beneficiosos para la salud humana como el ácido vacénico y ácido ruménico (Rana *et al.*, 2012; Vasta *et al.*, 2009a).

El orujo de uva es un subproducto de la elaboración del vino que presenta un alto contenido en compuestos fenólicos con alta capacidad antioxidante y podría ser una alternativa interesante con bajo coste para incrementar el contenido en ácidos grasos funcionales en la grasa de pequeños rumiantes.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la inclusión de dos niveles de orujo de uva en relación con un antioxidante habitualmente utilizado (vitamina E) en raciones de ovejas de raza Churra en inicio de lactación, sobre el perfil de ácidos grasos de la carne de sus lechazos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se emplearon cuarenta y ocho ovejas de raza Churra (59,2 ± 4,91 kg), previamente seleccionadas y alimentadas hasta el momento del parto con la misma dieta. Dos días después del parto, las ovejas se asignaron de forma equilibrada según su producción de leche en la lactación anterior, prolificidad y peso, a cuatro tratamientos experimentales (12 ovejas y sus respectivos corderos). Las cuatro dietas experimentales consistieron en una ración total mezclada (TMR) y fueron las siguientes: control (CTRL), ración con vitamina E (VIT-E; 500 mg kg⁻¹ de α -tocoferol), ración con bajo contenido en orujo (OR-5; 5% de MS de orujo integral de vino tinto) y ración con alto contenido en orujo (OR-10; 10% de MS de orujo integral de vino tinto). La fórmula y composición de las raciones se presenta en la Tabla 1. Todas las raciones fueron suplementadas con 2,7 % de aceite de linaza. La ración se suministró a cada oveja repartida en dos comidas diarias.

Los corderos, fueron alimentados exclusivamente con leche materna y se sacrificaron al peso establecido en 11,5 kg. Después de 24 horas de oreo a 4°C, se extrajo el músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (LTL) de la media canal izquierda para evaluar el perfil de ácidos grasos de la carne.

La determinación de la composición de ésteres metílicos de los ácidos grasos de la grasa intramuscular de carne se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). El procedimiento seguido para la extracción y metilación de los ácidos grasos se realizó de acuerdo con lo descrito por Rubio *et al.* (2007).

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

La Tabla 2 muestra el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular de los lechazos pertenecientes a los distintos tratamientos experimentales.

El perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular de los corderos se encuentra dentro del rango presentado por otros autores, siendo el ácido oleico (C18:1), el ácido palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0) los más abundantes. La suplementación con vitamina E no

presentó un efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) sobre las concentraciones de SFA, PUFA y PUFA/SFA comparado con el tratamiento CTRL, lo cual está de acuerdo con otros autores (Aksu, *et al.*, 2004). Sin embargo, el nivel de MUFA fue inferior y la relación n3/n6 superior en los corderos del grupo VIT-E respecto al control.

Tabla 1. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales.

	CTRL	VIT-E	OR-5	OR-10
Ingredientes (% MS)				
Alfalfa deshidratada	35,0	35,0	33,0	31,1
Paja de cereales	9,07	9,07	9,07	9,07
Maíz grano	10,10	10,10	9,50	8,83
Harina de soja 44	15,3	15,3	14,7	14,0
Avena grano	9,25	9,25	8,50	7,90
Cebada grano	6,94	6,94	6,50	6,10
Pulpa de remolacha	6,97	6,97	6,57	6,15
Melaza de caña	3,67	3,67	3,46	3,15
Orujo de vino tinto	-	-	5,00	10,0
Aceite de linaza	2,7	2,7	2,7	2,7
¹ Corrector vitamínico mineral	1	1	1	1
Vitamina E (UI kg ⁻¹ MS)	50	500	50	50
Composición química (% MS)				
MS, %	89,3	89,3	86,7	84,1
Cenizas	7,85	7,85	7,76	7,67
FND	34,6	34,6	34,8	35,1
PB	19,2	19,2	18,8	18,5
EE	5,16	5,16	5,39	5,62

¹ Mervigor Ovejas ©

La incorporación de orujo de uva en las dietas no mostró efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) sobre el contenido en SFA, PUFA y PUFA/SFA, sin embargo el contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) fue inferior ($P < 0.05$) que en el tratamiento CTRL y no presentó diferencias ($P > 0.05$) respecto al tratamiento VIT-E.

El contenido en RA y VA fue significativamente superior ($P < 0.05$) en aquellos animales cuyas madres ingirieron orujo de uva con la ración. Algunos autores han relacionado la ingestión de polifenoles y taninos condensados con cambios en la flora bacteriana implicada en los procesos BH ruminal (Rana *et al.*, 2012), inhibiendo la conversión de VA a ácido esteárico y favoreciendo su acumulación a nivel ruminal (Vasta *et al.*, 2009a). Además, también ha sido indicado que la enzima Δ^9 -desaturasa puede verse influenciada por la presencia de taninos y favorecer la síntesis endógena de RA a partir de VA en los tejidos animales (Min *et al.*, 2003, Vasta *et al.*, 2009b).

Como conclusión de este trabajo podemos indicar que los niveles de ácido vacénico, ácido ruménico y la relación n3/n6 en la grasa intramuscular de los lechazos aumenta con la incorporación de vitamina E y orujo de uva en la ración de las ovejas, sin que los niveles de PUFA y SFA se vean afectados.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular de los lechazos pertenecientes a los distintos tratamientos experimentales. (% sobre el total de los ésteres metílicos de los ácidos grasos).

	Tratamiento				RSD	Nivel de significación.
	CTRL	VIT-E	OR-5	OR-10		
C14:0	6,41	6,94	6,96	6,54	1,077	ns
C16:0	23,08	23,85	23,99	23,77	1,639	ns
C16:1	2,27	2,29	2,24	2,39	0,250	ns
C18:0	13,55	13,86	13,58	13,15	1,088	ns
C18:1	35,26 ^a	32,51 ^b	31,52 ^b	32,21 ^b	2,879	**
<i>Trans</i> -11 C18:1 (VA)	3,63 ^a	4,029 ^b	4,41 ^b	4,55 ^b	0,815	**
C18:2	6,06	6,13	6,55	6,78	1,093	ns
C18:3	1,32	1,62	1,51	1,38	0,352	†
<i>Cis</i> -9 <i>trans</i> -11 C18:2 (RA)	1,18 ^a	1,37 ^{ac}	1,52 ^{bc}	1,71 ^b	0,361	***
C20:4	2,53	2,32	2,47	2,55	0,711	ns
C20:5 (EPA)	0,64	0,74	0,75	0,71	0,221	ns
C22:5 (DPA)	0,94	0,994	1,03	1,05	0,270	ns
C22:6 (DHA)	0,65	0,65	0,70	0,70	0,237	ns
SFA	44,98	46,69	46,61	45,32	2,631	ns
MUFA	41,54 ^a	39,34 ^b	38,68 ^b	39,63 ^b	2,421	**
PUFA	13,48	13,97	14,70	15,05	2,661	ns
n3	3,54	4,00	3,98	3,83	0,961	ns
n6	8,76	8,60	9,19	9,51	1,787	ns
n3/n6	0,40 ^a	0,46 ^b	0,44 ^b	0,40 ^a	0,060	*

Nivel de significación: ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$
 Letras distintas en una misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Aksu *et al.* 2004. J. Muscle Foods 15, 173-182. • Min *et al.* 2003. Anim. Feed Sci. Tech. 106, 3-19. • Nieto, G. 2013. Eur. Food Res. Technol. 236, 379-389. • Priolo *et al.* 2000. J. Anim. Sci. 78, 810-816. • Rana *et al.* 2012. Meat Sci. 90, 558-563. • Rubio *et al.* 2007. Meat Sci. 76, 128-137. • Vasta *et al.* 2009a. J. Anim. Sci. 87, 2674-2684. • Vasta *et al.* 2009b. Meat Sci. 82, 357-364.

Agradecimientos: Financiación procedente de INIA (proyecto RTA2010-0068-C02-02) y de la Consejería de Educación de la JCyL (proyecto VA196A11-2). C. Guerra-Rivas disfruta de una beca FPU del Ministerio de Educación.

RUMENIC AND VACCENIC ACIDS FROM INTRAMUSCULAR FAT OF SUCKLING LAMBS ARE INCREASED WHEN GRAPE POMACE IS INCLUDED IN THE DIET OF LACTATING EWES

ABSTRACT: Forty-eight Churra ewes were used to study the effects of 500 mg kg⁻¹ of vitamin E, 5% or 10% of grape pomace in ewes diets on meat fatty acid profile of their suckling lambs. The lambs were fed exclusively by suckling from their respective mothers and slaughtered when they reached 11.5 kg body weight. Lambs whose mothers were supplemented with grape pomace showed higher ($P < 0.05$) rumenic acid and vaccenic acid than control group.

Keywords: grape pomace, suckling lambs, meat fatty acids

LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA CARNE DE LECHAZO SE INCREMENTA A LO LARGO DE SU ALMACENAMIENTO AL INCORPORAR ORUJO DE UVA EN LA RACIÓN DE LAS OVEJAS

Guerra-Rivas, C., Vieira, C., Gallardo, B., Mantecón, A.R., Lavín, P. y Manso*, T.
Área de Producción Animal. Dpto. Ciencias Agroforestales. ETS Ingenierías Agrarias.
Universidad de Valladolid. 34004 Palencia.

*tmanso@agro.uva.es

INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas para prevenir la oxidación lipídica y la degradación del color de la carne es la utilización de antioxidantes en las raciones. El antioxidante más utilizado es el α -tocoferol acetato de síntesis (Faustman *et al.*, 1998; 2010). El origen sintético y la eficacia limitada en algunas ocasiones de la vitamina E ha dado lugar a que el desarrollo de antioxidantes de origen natural con posible utilización en alimentación animal presente un gran interés (Gladine *et al.*, 2007).

Algunos autores han observado con diferentes extractos vegetales correlaciones lineales y positivas entre el contenido en compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante (Zheng y Wang, 2001). Además, ha sido indicado que la suplementación de la dieta con sustancias de naturaleza fenólica mejora la estabilidad del color de la carne a lo largo de su almacenamiento (Vasta y Luciano, 2011). En este sentido, el alto contenido en compuestos fenólicos de los residuos de vinificación podría resultar interesante como antioxidantes en las raciones de ganado ovino.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la inclusión de dos niveles de orujo de uva en relación con el antioxidante habitualmente utilizado (vitamina E) en raciones de ovejas de raza Churra en inicio de lactación, sobre la oxidación lipídica (TBARS) y el color de la carne de sus lechazos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de cuarenta y ocho ovejas de raza Churra con un peso medio inicial de $59,2 \pm 4,91$ kg. Previamente fueron seleccionadas y alimentadas hasta el momento del parto con la misma ración. Dos días después del parto, las ovejas se asignaron equilibradamente en función de su producción de leche en la anterior lactación, prolificidad y peso, a cada uno de los cuatro tratamientos experimentales (12 ovejas y sus respectivos corderos). Las cuatro dietas experimentales consistieron en una ración total mezclada (TMR), cuya fórmula y composición está de acuerdo con Guerra-Rivas *et al.* (2015). Las raciones fueron las siguientes: control (CTRL), ración con vitamina E (VIT-E; 500 mg kg⁻¹ de α -tocoferol), ración con bajo contenido en orujo (OR-5; 5% de MS de orujo integral de vino tinto) y ración con alto contenido en orujo (OR-10; 10% de MS de orujo integral de vino tinto). Todas las raciones fueron suplementadas con 2,7 % de aceite de linaza. La ración se suministró a cada oveja repartida en dos comidas diarias.

Los corderos fueron alimentados exclusivamente con leche materna y se sacrificaron al peso establecido de 11,5 kg. Después de 24 horas de oreo a 4°C, se extrajo el músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (LTL) de la media canal derecha para evaluar la oxidación lipídica de la carne (TBARS) y de la media canal izquierda para la medida instrumental del color.

Para el análisis de TBARS y la medida del color se utilizaron 5 animales de cada tratamiento. Cada porción de lomo procedente de los lechazos seleccionados se dividió en 5 trozos que se distribuyeron en bandejas y se envasaron con una mezcla de gases (80% O₂ y 20% CO₂). El muestreo se realizó los días 0, 4, 7, 11 y 14 de almacenamiento simulando las condiciones de luz y temperatura en el punto de venta. La carne de las bandejas correspondientes al día 0 de envasado fue analizada sin ser envasada.

La determinación de la oxidación lipídica de la carne se realizó utilizando el método del ácido tiobarbitúico (TBA) descrito por Maraschiello *et al.* (1999). El color de la carne se determinó empleando un espectrofotómetro de reflectancia (CM-2600d, Konica Minolta) a

partir de los parámetros del espacio de color CIELAB (L^* , luminosidad; a^* , índice de rojo; b^* , índice de amarillo).

Todos los datos se analizaron utilizando el modelo lineal general (PROC MIXED), del paquete estadístico SAS 9.2. (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presenta la evolución de la oxidación lipídica y del color durante el almacenamiento de la carne de los lechazos pertenecientes a los distintos tratamientos experimentales.

El contenido de malondialdehído (MDA) aumentó con el tiempo de refrigeración. El nivel de MDA fue numéricamente inferior a partir del día 3 y significativamente inferior ($P < 0.05$) a partir del día 10 de almacenamiento en la carne de los animales cuyas madres recibieron vitamina E y orujo de uva en la ración respecto al tratamiento CTRL.

La incorporación de antioxidantes en la dieta de rumiantes es una estrategia interesante para prevenir la oxidación lipídica de los productos animales. Un amplio número de trabajos en ganado ovino han corroborado el efecto protector de la vitamina E contra el deterioro oxidativo de la carne durante su almacenamiento (Faustman *et al.*, 1998).

La mejora de la estabilidad oxidativa al incluir orujo de uva en las dietas, puede ser atribuida al efecto protector frente a la lipoperoxidación de los polifenoles, especialmente los taninos condensados, presentes en el orujo. Algunos autores han indicado que los taninos poseen mayor potencial antioxidante que cualquier otro tipo de polifenol (Krishnaiah *et al.*, 2009). Múltiples trabajos han corroborado los beneficios de los taninos y de otras sustancias de origen fenólico en dietas de corderos sobre la oxidación lipídica (Luciano *et al.*, 2011; Bañón *et al.*, 2012; Andrés *et al.*, 2014).

En relación a los parámetros que definen el color apenas se produjeron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los diferentes tratamientos experimentales hasta el día 14 de almacenamiento. En este momento los animales de los tratamientos VIT-E y OR-5 presentaron valores inferiores ($P < 0.05$) de L^* y superiores de b^* respecto a los otros tratamientos, y el parámetro a^* fue significativamente inferior ($P < 0.05$) en el tratamiento control respecto a los otros grupos.

Como conclusión de este trabajo podemos indicar que la incorporación de orujo de uva tinta en raciones de ovejas Churras en inicio de lactación mejoró la estabilidad lipídica de la carne de los lechazos a partir del día 10 de almacenamiento mostrando un efecto similar al ejercido por la vitamina E, sin que los parámetros de color mostrasen grandes diferencias debidas al tratamiento experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrés *et al.* 2014. Meat Sci. 96, 806-811
- Bañón *et al.* 2012. Meat Sci. 90, 579-583.
- Faustman *et al.* 2010. Meat Sci. 86, 86-94.
- Faustman *et al.* 1998. J. Anim. Sci. 76, 1019-1026.
- Gladine *et al.* 2007. Anim. Feed Sci. Tech. 139, 257-272.
- Guerra-Rivas *et al.* 2015. En: XVI Jornadas sobre Producción Animal, Edita: Asociación Interprofesional para el desarrollo agrario. *In press.*
- Krishnaiah, *et al.* 2009. J. Medicinal Plants Res. 3, 67-72.
- Luciano *et al.* 2011. Food Chem. 124, 1036-1042.
- Maraschiello *et al.* 1999. J. Agric. Food Chem. 47, 867-872.
- Vasta y Luciano, 2011. Small Ruminant Res., 101, 150-159.
- Zheng y Wang, 2001. J. Agric. Food Chem. 49, 5165-5170.

Agradecimientos: Financiación procedente de INIA (proyecto RTA2010-0068-C02-02) y de la Consejería de Educación de la JCYL (proyecto VA196A11-2). C. Guerra-Rivas disfruta de una beca FPU del Ministerio de Educación.

OXIDANT STABILITY OF MEAT FROM SUCKLINGS LAMBS IS IMPROVED WHEN GRAPE POMACE IS INCLUDED IN THE DIET OF LACTATING EWES

ABSTRACT: Forty-eight Churra ewes were used to study the effects of supplementing diets with 500 mg k⁻¹ of vitamin E, 5% and 10 % of grape pomace on meat TBARS concentration and colour parameters during storage under retail display conditions. Lipid oxidation were numerically lower along all storage and significantly ($P < 0.05$) lower from day 10 of storage in meat from animals belonging VIT-E and grape pomace groups than CTRL animals.

Keywords: grape pomace, suckling lambs, meat lipid oxidation, meat colour

Tabla 1. Evolución de la oxidación lipídica (TBARS; $\mu\text{g MDA g}^{-1}$ carne) y de los parámetros de color (L^* , a^* , b^*) a lo largo del almacenamiento de la carne de los lechazos pertenecientes a los distintos tratamientos experimentales

	día	Tratamiento				SED	P-valor		
		CTRL	VIT-E	OR-5	OR-10		Tratamiento	Día	T x D
MDA	0	0,70	0,13	0,04	0,42	0,371	0,0001	0,0001	0,4234
	3	1,27	0,56	0,70	0,72				
	7	2,51	1,75	1,30	0,98				
	10	3,66 ^a	2,16 ^{ab}	1,70 ^b	1,81 ^b				
	14	6,74 ^a	3,62 ^b	3,80 ^b	3,16 ^b				
L*	0	49,28	51,71	49,76	50,58	0,652	0,0645	0,0001	0,0406
	3	49,72	52,59	50,49	51,48				
	7	49,36	51,64	50,32	50,87				
	10	48,14	50,03	49,04	48,49				
	14	49,01 ^a	45,08 ^b	43,47 ^b	48,10 ^a				
a*	0	2,82	1,85	3,22	2,47	0,427	0,0235	0,0004	0,5333
	3	4,11 ^a	2,05 ^b	3,44 ^{ab}	3,47 ^{ab}				
	7	5,05	3,65	4,49	3,97				
	10	5,29	3,54	4,65	3,81				
	14	3,25 ^a	4,32 ^{ab}	5,70 ^b	4,32 ^{ab}				
b*	0	13,41 ^a	9,91 ^b	9,54 ^b	10,21 ^b	0,453	0,8217	0,0001	0,0001
	3	13,24	12,87	12,81	12,39				
	7	12,05	12,27	11,53	11,31				
	10	11,74 ^a	12,17 ^a	11,89 ^a	14,98 ^b				
	14	15,92 ^a	19,47 ^b	19,16 ^b	16,22 ^a				

Nivel de significación: ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Letras distintas en una misma línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

SEMILLA DE COLZA PARA OVEJAS EN ORDEÑO: EFECTO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE

Delgado, D., Asensio-Vegas, C., Tabernero de Paz, M.J., Rodríguez, L. y Bodas*, R. Instituto Tecnológico Agrario (ITACyL) - Subdirección de Investigación y Tecnología. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León. *bodrodra@itacyl.es

INTRODUCCIÓN

El empleo de aceites o semillas de oleaginosas en la alimentación del ganado ovino es un método para modificar el perfil de ácidos grasos de la leche. Por ejemplo, el aceite de lino provoca un incremento en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de la leche de oveja, reduciendo la proporción de los insaturados (Manso *et al.*, 2011). Entre las semillas de oleaginosas cabe mencionar la de colza, que se encuentra entre los cultivos tradicionales de Castilla y León. Esta semilla tiene un perfil de ácidos grasos más rico en oleico y linoleico que el lino (De Blas, 2003), y se ha visto que su empleo en raciones para ganado vacuno lechero da lugar a un aumento de la proporción de ácidos grasos monoinsaturados en la leche (fundamentalmente oleico) y a una reducción del porcentaje de saturados (Lerch *et al.*, 2012a, b). Es de esperar que un cambio en la composición en ácidos grasos de la leche tenga un reflejo directo sobre la de sus productos derivados (Bodas *et al.*, 2010). Por consiguiente, la utilización de semilla de colza en la alimentación del ganado lechero puede plantearse como una alternativa viable para enriquecer los consiguientes derivados lácteos en ácidos grasos monoinsaturados, si bien como paso previo deben valorarse los posibles efectos de esta materia prima sobre el rendimiento de los animales y las características de la leche.

El presente trabajo se planteó con el objetivo estudiar los efectos de la incorporación de un 5% de semilla de colza en la dieta para ovejas de raza assaf en lactación sobre el perfil de ácidos grasos de la leche obtenida en condiciones prácticas de explotación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos grupos de ovejas (n=100/grupo) en la misma etapa de lactación (2,5 meses tras el parto) y con similar nivel de producción (2,1±0,1 l/día) y composición de leche. Uno de los grupos (Control) recibió una ración total mezclada, elaborada diariamente a base de silo y heno de alfalfa, paja, pulpa de remolacha y girasol, granos de cereales, algodón y corrector (4,9% EE, 14,9% PB, 30,0% FND) y distribuida a voluntad mediante cintas de alimentación. El otro grupo (Colza) recibió una ración similar, pero a la que se le había añadido un 5% de semilla de colza aplastada en sustitución de parte de la semilla algodón de la ración (7,1% EE, 13,0% PB, 13,3% FND). Aparte de la alimentación, todos los animales fueron manejados en idénticas condiciones, ocupando espacios contiguos dentro de la misma nave. Las ovejas se ordeñaron dos veces al día conforme al manejo habitual en la explotación en una sala rotativa con 30 puestos de ordeño, una presión de vacío de 42 kPa, 120 pulsaciones por minuto y una relación de pulsación del 50%.

Tres semanas después de introducir la colza en la ración se midió la producción de leche individual de todos los animales y se tomaron muestras de tanque de cada grupo durante 4 días seguidos para analizar su composición química. Cuando los animales llevaban 5 semanas recibiendo las raciones experimentales se tomaron muestras de leche del tanque durante 4 días seguidos, para analizar su composición química y el perfil de ácidos grasos. Dadas las condiciones de recogida de la leche, no fue posible determinar con total precisión la cantidad de leche producida, por lo que este parámetro no se ha incluido en el análisis correspondiente a las 5 semanas de periodo experimental.

El contenido en proteína y grasa de la leche se determinó mediante espectroscopía IR transformada de Fourier (FTIR; Milko-Scan FT2, Foss Electric, Hillerod, Dinamarca), siguiendo el procedimiento PE/LILCYL/07 acreditado por ENAC. El contenido en ácidos grasos se determinó mediante análisis por cromatografía (ISO 5508) tras extraer la grasa (ISO 14156) y preparar los metil ésteres de los ácidos grasos (ISO 5509).

Para analizar los datos de producción y composición química de las muestras individuales de leche, las ovejas se agruparon en 3 sublotos dentro de cada grupo (Control y Colza) en función de su nivel de producción inicial (alto, >2500 g/día; medio, 1900-2500 g/día; bajo, <1900 g/día). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía, considerando el sub lote como efecto bloque y los datos previos de producción de leche

estandarizada para grasa y proteína como covariable. Los datos semanales de composición química de leche del tanque se promediaron para cada ración y día. Después fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía, con la ración como única fuente de variación. Para todos los análisis se utilizó el software estadístico SPSS 16.0 para Windows (IBM Corp., Nueva York, EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de un 5% de semilla de colza aplastada en la ración de las ovejas no dio lugar a cambios significativos ($P>0,10$) en la producción de leche tras 3 semanas recibiendo este ingrediente (Tabla 1). Sin embargo, se observó un incremento significativo tanto en el porcentaje como en la producción de grasa en la leche ($P<0,001$), así como una disminución significativa del porcentaje de proteína ($P<0,001$), sin que variase la producción total de proteína ($P>0,10$). Estos cambios dieron lugar a un incremento en el porcentaje y la producción de extracto quesero ($P<0,001$) en el grupo de animales que recibió la ración suplementada con semilla de colza.

Tabla 1. Producción y composición de la leche (medias de valores individuales) para cada grupo experimental después de 3 semanas recibiendo su correspondiente dieta.

	Control	Colza	d.e.r.	Nivel P
Producción de leche (kg/día)	2,04	2,01	0,510	n.s.
Grasa (%)	5,58	6,60	0,924	***
Proteína (%)	5,40	5,15	0,469	***
Extracto quesero (%)	10,98	11,74	1,186	***
Grasa (g/día)	112	131	29,5	***
Proteína (g/día)	109	102	25,3	n.s.
Extracto quesero (g/día)	110	117	11,9	***

d.e.r.=desviación estándar residual. Nivel P: n.s. (no significativo) = $P>0,10$; *** = $P<0,001$.

Tabla 2. Valores medios de composición química de la leche y principales grupos de ácidos grasos para cada lote experimental después de recibir durante 5 semanas colza en la dieta.

	Control	Colza	d.e.r.	Nivel P
Composición química				
Grasa (%)	6,65	6,77	0,323	n.s.
Proteína (%)	5,44	5,38	0,033	*
Caseína	4,01	3,99	0,023	n.s.
Urea	523	493	47,4	n.s.
Extracto seco (%)	17,8	17,9	0,31	n.s.
Extracto quesero (%)	12,1	12,2	0,34	n.s.
Grupos de ácidos grasos (%)				
Saturados	70,9	66,3	0,75	*
Monoinsaturados	25,2	30,3	0,65	*
Poliinsaturados	5,73	5,02	0,138	*
n-3	0,30	0,38	0,032	*
n-6	4,67	3,67	0,114	*
Poliinsaturados/Saturados	0,08	0,008	0,001	n.s.
n-3/n-6	0,06	0,10	0,003	*

d.e.r.=desviación estándar residual. Nivel P: n.s. (no significativo) = $P>0,10$; * = $P<0,05$.

Por lo que respecta a la composición química de la leche tras 5 semanas suplementando las dietas con semilla de colza, el efecto sobre el porcentaje de grasa había desaparecido, mostrando ambos grupos valores similares ($P>0,10$; Tabla 2). El resto de los componentes

de la leche no variaron su concentración, a excepción del contenido en proteína, que se mantuvo más bajo en el grupo Colza ($P < 0,05$). La proporción de ácidos grasos saturados, poliinsaturados y omega-6 (n-6) disminuyó, y aumentó la de monoinsaturados y omega-3 (n-3), así como la relación n-3/n-6 ($P < 0,05$).

Es posible modificar el perfil de ácidos grasos de la leche de oveja mediante la inclusión de un 5% de semilla aplastada de colza, sin que ello conlleve un descenso en la producción de extracto seco, pese a las modificaciones en el contenido en proteína de la leche.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bodas *et al.*, 2010. J. Agric. Food Chem. 58: 10493-10502. • De Blas *et al.*, 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (3ª edición). • Lerch *et al.*, 2012a. J. Dairy Sci. 95: 5221-5241 • Lerch *et al.*, 2012b. J. Dairy Sci. 95: 7269-7287 • Manso *et al.*, 2011. Animal 5: 1659-1667 •

Agradecimientos: Alberto García Torés y su Granja de Desarrollo Ovino AGM. El trabajo ha sido financiado conjuntamente por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), la Granja de Desarrollo Ovino AGM y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, 'Europa impulsa nuestro crecimiento').

RAPESEED FOR MILKING EWES: EFFECT ON MILK QUALITY

ABSTRACT: Two groups of 100 milking ewes were used to study the effects of including 5% of rapeseed in their diet on milk chemical and fatty acid composition. One group received the Control diet (alfalfa hay and silage, straw, beet and sunflower pulp, grains, cottonseed and mineral supplement but without rapeseed) and the other received a diet where part of the cottonseed was replaced by crushed rapeseed (5% in the diet, group 'Colza'). After three weeks on their respective diets, individual milk yield was measured, and bulk tank samples were obtained to determine chemical composition. Bulk tank samples were also taken after five weeks receiving rapeseed for fatty acid analysis. Milk yield was not affected ($P > 0.10$), albeit a decrease in protein and increase in fat and total solids contents were observed ($P < 0.001$) in 'Colza' milk. The effect on milk fat contents disappeared after five weeks on the corresponding diets, but protein contents remained lower in 'Colza' than in 'Control' group ($P < 0.05$). Including 5% of rapeseed in the diet for milking ewes reduced saturated, poliunsaturated and n-6 fatty acids content while increasing monounsaturated and n-3 fatty acids ($P < 0.05$).

Keywords: colza, fatty acids, MUFA, protein.

INFLUENCIA DEL EXTRACTO DE PIEL DE CACAHUETE SOBRE LOS PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA HAMBURGUESA DE OVEJA ENVASADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA

Munekata, P.E.¹, Fernandes, R. de P.P.², Trindade, M..A.¹,
de Melo, M.P.² y Lorenzo, J.M.³

- ¹Department of Food Engineering, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, 225 Duque de Caxias Norte Ave, 13.635-900, Pirassununga, Brazil.
²Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, 225 Duque de Caxias Norte Ave, 13.635-900, Pirassununga, Brazil.
³Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia Nº 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense, Spain
* paulo.munekata@usp.br

INTRODUCCIÓN

Durante el procesado de la carne tienen lugar una serie de fenómenos oxidativos que dan lugar a cambios en el color, sabor, aroma y textura y que afectan a la calidad organoléptica de la misma (Lorenzo y Gómez, 2012). De manera tradicional, la industria cárnica ha empleado un gran número de antioxidantes sintéticos como método eficaz y económico para disminuir la aparición de fenómenos oxidativos, y con ello minimizar la aparición de olores y sabores desagradables o la pérdida de vitaminas o aminoácidos en el producto final (Laguerre *et al.*, 2007). Sin embargo, el empleo de antioxidantes sintéticos está cuestionado desde el punto de vista de la seguridad alimentaria ya que diversos estudios clínicos han comprobado que niveles altos de BHT, BHA y TBHQ pueden actuar como agentes promotores del cáncer y/o teratógenos (Raghavan y Richards, 2007). En este sentido, el empleo de subproductos procedentes de la industria alimentaria como es el caso de la piel de cacahuete rica en compuesto fenólicos (Yu *et al.*, 2010) puede ser una alternativa a los antioxidantes sintéticos.

Por otro lado, el envasado en atmósfera modificada en combinación con el empleo de antioxidantes ha significado un avance extraordinario como método para incrementar la conservación de carne fresca. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del extracto de piel de cacahuete sobre los parámetros físico-químicos (pH, color y oxidación lipídica) de la hamburguesa de oveja envasada en atmósfera modificada durante 20 días a 2 °C.

MATERIAL Y MÉTODOS

La piel de cacahuete (variedad Runner IAC886) fue donada por una cooperativa de productores locales de cacahuetes de Brasil. Antes de la extracción, las partículas del grano de cacahuete fueron retiradas y descartadas. La extracción fue realizada siguiendo el procedimiento de Infante *et al.* (2013): la piel (30 g) y 300 ml de etanol al 80% se dejaron en un baño de agua a 60 °C durante 50 minutos. Posteriormente, la mezcla se metió en un baño de ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente. El extracto fue centrifugado a 6000 rpm durante 15 minutos y filtrado a través de papel Whatman No. 3. El extracto se concentró hasta que se alcanzó el 20% de su volumen inicial (60 ml) a 55 °C y -600 kPa. Se fabricaron tres lotes de hamburguesas de carne de oveja de desvieje [control (CON), eritorbato de sodio (ERT) y el extracto de piel de cacahuete (EPC)]. La carne se picó a través de una placa de 6 mm en máquina picadora refrigerada (La Minerva, Bolonia, Italia). Una vez picada, la carne se mezcló con 10 g de NaCl por kg de carne y 50 mg/kg de ERT o 1000 mg/kg de extracto de piel de cacahuete. Las hamburguesas fueron fabricadas en porciones de 100 g (n = 2 por lote y tiempo de almacenamiento) y envasadas en bandejas de 300 mm poliestireno y selladas con película de 74 mm de polietileno. La composición de la atmósfera modificada fue 80% O₂-20% de CO₂. Las bandejas se almacenaron a 2 ± 1 °C en presencia de luz para simular las condiciones de supermercados. Los análisis se llevaron a cabo a 0, 5, 10, 15 y 20 días de almacenamiento. El pH, color e índice de TBARS se fueron determinar por duplicado. La medida del pH se realizó empleando un pH-metro portátil Hanna Instruments (Eibar, España) equipado con electrodo de penetración de 6 mm de diámetro y una sonda de temperatura. La determinación del color se realizó empleando un colorímetro CM-600d Konica Minolta (Osaka, Japón); para la medición se usó el sistema de coordenadas de color CIE, determinando las coordenadas cromáticas L* (luminosidad),

a* (índice de rojo) y b* (índice de amarillo). Las mediciones de color se hicieron en la superficie de las hamburguesas por triplicado en tres lugares seleccionados al azar. Para evaluar la estabilidad de lípidos se siguió el método propuesto por Vyncke (1975); para ello se disolvieron 2 g de muestra en ácido tricloroacético al 5% y se homogeneizaron en un Ultra-Turrax (IKA T25 básico, Staufen, Alemania) durante 2 min. El homogeneizado se mantuvo a -10 °C durante 10 min y posteriormente se centrifugó (Beckman Coulter Allegra X-22, Fullerton, California, EE.UU.) a 2360 × g durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de filtro Whatman No. 1 (Maidstone, Reino Unido). El filtrado (5 ml) se mezcló con una solución de TBA 0,02 M (5 ml, Acros Organics, Geel, Bélgica) y se incubó en un baño de agua a 96 °C durante 40 min. La absorbancia se midió a 532 nm. Los valores de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se calcularon con una curva estándar de malonaldehído con 1,1-3,3 tetraetoxipropano (TEP) y se expresó como mg de malondialdehído (MDA)/kg de muestra. Finalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento del Modelo Lineal General (MLG) del paquete SPSS (SPSS 19.0, Chicago, IL, EE.UU.) para las variables del estudio, utilizando el test de Duncan cuando las diferencias entre las medias era significativa ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La influencia de los extractos sobre la evolución del pH, color e índice de TBARS durante el periodo de almacenamiento de las hamburguesas de corderos se muestra en la Tabla 1. Los valores de pH no sufrieron variaciones significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos ni durante el tiempo de refrigeración oscilando los valores entre 5,80 y 5,94. Estos resultados coinciden con los observados previamente por Lorenzo *et al.* (2014) quienes no encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los valores de pH durante el periodo de almacenamiento de hamburguesas; sin embargo si encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los diferentes extractos naturales empleados. Con respecto a los parámetros de color, las muestras de hamburguesa sufrieron un proceso de decolorización con el tiempo de almacenamiento, principalmente debía a la pérdida de color rojo. En este sentido, las muestras tratadas con extracto de piel de cacahuete mostraron un índice de color rojo (a*) significativamente ($P < 0,01$) más alto que las muestras control (9,56 vs. 7,50) tras 20 días de almacenamiento a refrigeración. Este efecto estabilizador del extracto de piel de cacahuete sobre el color de las hamburguesas es similar al encontrado para otros extractos naturales como el aguacate (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011), romero (Lara *et al.*, 2011) y uva (Garrido *et al.*, 2011). Durante el periodo de refrigeración los valores de TBARS incrementaron significativamente ($P < 0,001$) en los tres lotes estudiados. Tras 20 días de almacenamiento los niveles de TBARS fueron significativamente ($P < 0,001$) más altos en el lote control en comparación con los otros dos lotes (6,45 vs. 3,95 vs. 3,79 mg MDA/kg muestra para CON, ERT y EPC, respectivamente). Estos resultados coinciden los descritos por otros autores (Ibrahim *et al.*, 2010; Lara *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 2014; Pateiro *et al.*, 2014) quienes observaron niveles más bajos de oxidación en muestras tratadas con extractos naturales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Garrido, M.D., Auqui, M., Martí, N., and Linares, M.B. (2011). LWT Food Sci. Tech. 44: 2238-2243 • Ibrahim, H.M., Abou-Arab, A.A., and Abu, S.F.M. (2010). J. Food Tech. 8: 134-142 • Infante, J., Selani, M.M., Toledo, N.M.V., Silveira-Diniz, M.F., Alencar, S.M., and Spoto, M.H.F. (2013). Alimentos e Nutrição 24: 87-91 • Laguerre, M., Lecomte, J., and Villeneuve, P. (2007). Prog Lipid Res. 46: 244-282 • Lara, M.S., Gutierrez, J.I., Timón, M., and Andrés, A.I. (2011). Meat Sci. 88: 481-488 • Lorenzo, J.M., and Gómez, M. (2012). Meat Sci. 92: 610-618 • Lorenzo, J.M., Sineiro, J., Amado, I.R., and Franco, D. (2014). Meat Sci. 96: 526-534 • Pateiro, M., Lorenzo, J.M., Amado, I.R., and Franco, D. (2014). Food Chem. 147:386-394 • Raghavan, S., and Richards, M. P. (2007). Food Chem. 102: 818-826 • Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., and Estévez, M. (2011). Meat Sci. 89: 166-173 • Vyncke, W. (1975). Fette seifen Anstichm 77: 239-240 • Yu, J., Ahmedna, M., and Goktepe, I. (2010). Int. J. Food Sci. Tech. 45, 1337-1344

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP n.º 2013/14120-8) y a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES n.º 248705/2013-0).

Tabla 1. Efecto del extracto sobre la evolución del pH, color e índice de TBARS durante el periodo de almacenamiento de las hamburguesas de corderos

Parámetros	Lotes	Días de almacenamiento					Sig.
		0	5	10	15	20	
pH	T1	5,87±0,03	5,90±0,01	5,90±0,02	5,92±0,03	5,95±0,08	n.s.
	T2	5,85±0,04	5,87±0,01	5,94±0,05	5,91±0,02	5,84±0,03	n.s.
	T3	5,84±0,04	5,85±0,01	5,91±0,03	5,91±0,02	5,80±0,05	n.s.
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
L*	T1	39,41±0,67 ^{a1}	39,43±0,75 ^a	41,25±1,13 ^a	43,28±0,43 ^{ab}	45,83±2,82 ^b	*
	T2	42,27±0,69 ^z	40,95±0,41	41,65±0,54	42,18±1,16	40,95±1,07	n.s.
	T3	40,35±0,86 ^{1,2}	43,64±1,62	42,33±0,85	42,41±1,64	41,57±0,94	n.s.
	Sign.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
a*	T1	19,51±0,38 ^d	16,37±0,90 ^c	12,36±0,87 ^{b1}	10,71±0,12 ^{b1}	7,50±0,27 ^{a1}	***
	T2	21,25±0,49 ^d	17,55±1,07 ^c	14,80±0,25 ^{b2}	12,94±0,76 ^{b2}	10,87±0,25 ^{a3}	***
	T3	20,43±0,30 ^d	15,92±1,14 ^c	14,93±0,41 ^{bc2}	13,57±0,41 ^{b2}	9,56±0,46 ^{a2}	***
	Sign.	n.s.	n.s.	*	**	**	
b*	T1	17,64±0,56	15,99±0,80	15,61±0,94	16,35±0,29	16,59±0,76	n.s.
	T2	19,23±0,33 ^c	17,23±0,43 ^b	16,66±0,36 ^{ab}	16,14±0,24 ^{ab}	15,44±0,64 ^a	***
	T3	18,04±0,37 ^c	16,93±0,46 ^{bc}	16,37±0,23 ^b	15,93±0,56 ^b	14,40±0,47 ^a	***
	Sign.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TBARS (mg MDA/kg muestra)	T1	2,55±0,10 ^a	4,83±0,06 ^{b2}	5,48±0,09 ^{c3}	6,34±0,19 ^{d2}	6,45±0,37 ^{d2}	***
	T2	2,37±0,19 ^a	3,54±0,12 ^{bc1}	3,42±0,16 ^{b2}	3,90±0,05 ^{c1}	3,95±0,11 ^{c1}	***
	T3	1,92±0,16 ^a	3,11±0,32 ^{b1}	2,93±0,04 ^{b1}	3,33±0,25 ^{bc1}	3,79±0,16 ^{c1}	***
	Sign.	n.s.	**	***	***	***	

Valores expresados como media ± error estándar

SEM: Error estándar de la media

^{a-d} Los valores en la misma fila con distinto superíndice fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) respecto al tiempo de almacenamiento

¹⁻³ Los valores en la misma columna con distinto superíndice fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) respecto al tratamiento

Nivel de significancia del efecto del cruce genético en los atributos sensoriales: no significativo (n.s.), $P > 0,05$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Lotes: T1 = control, T2 = eritorbato, T3 = piel de cacahuete

INFLUENCE OF PEANUT SKIN EXTRACT ON PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS OF SHEEP BURGER PACKAGED IN MODIFIED ATMOSPHERE

ABSTRACT: The effect of peanut skin extract on physico-chemical parameter of sheep burger packaged in modified atmosphere was studied. During 20 days of storage in modified atmosphere packs at 2 °C, pH, color and lipid oxidation of sheep burger were assessed and compared with a synthetic antioxidant (erythorbate) and control batch. The pH values did not show significant ($P > 0,05$) differences among groups over storage time. On the other hand, the addition of peanut skin extract had a significant ($P < 0,05$) effect on the color surface of sheep burgers. To this regards, samples manufactured with peanut skin extract showed significantly ($P < 0,01$) higher a* values compared to control group (9.56 vs. 7.50) after 20 of chilled storage. Regarding TBARS values, a significant ($P < 0,001$) increased was observed during the whole display. After 20 days of storage, control batch showed significantly ($P < 0,001$) higher TBARS values compared to the other ones (6.45 vs. 3.95 vs. 3.79 mg MDA/kg sample for control, erythorbate and peanut skin extract groups, respectively).

Keywords: Color parameters; Natural antioxidant; Peanut skin extract; Sheep burger.

INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SUBPRODUCTO DE TOMATE SOBRE EL CRECIMIENTO Y CALIDAD DE CARNE EN CORDEROS MERINOS.

López-Parra, M.M.¹, Muñoz-Regalado, B.¹, Timón, M.L.², Petró, M.J.², Andrés. A.I.² y Delgado-Adámez, J.³

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, Instituto de Investigaciones agrarias Finca La Orden-Valdesequera, CICYTEX. ²Tecnología de Alimentos. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. 06007 Badajoz. ³INTAEX, CICYTEX. *montana.lopez@gobex.es

INTRODUCCIÓN

La alimentación se considera el factor determinante de la viabilidad de las explotaciones ganaderas. La producción ganadera en los países mediterráneos está caracterizada por los altos precios y la escasez de cereales y forrajes (Molina-Alcaide y col., 2009). Debido a la baja rentabilidad de los pequeños rumiantes, adquiere gran importancia reducir costes, que supone entre el 60 % y el 80 % de los costes totales de mantenimiento del ganado (Pérez Baena y col., 2011).

Una estrategia para abaratar los costes de alimentación es el aprovechamiento de subproductos agroindustriales regionales, dado su gran volumen de producción. No son abundantes los trabajos sobre el uso de subproductos en rumiantes, siendo en su caso, mayoritariamente orientados hacia la inclusión en dietas de cebo de bovinos (Porte y col, 1993) o de vacuno de leche (Patel y col., 1971). En ovino las referencias son más restringidas aún (Guada y col., 1986) y limitadas a dietas de mantenimiento de ovejas adultas (Manterola y col., 1999). En este contexto, el objetivo de este ensayo fue analizar las repercusiones de la inclusión de ensilado de pulpa de tomate como suplementación durante el periodo de cebo de corderos merinos, sobre los índices zootécnicos y calidad de la carne.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 20 corderos machos de raza Merina, procedentes del rebaño del Instituto de Investigaciones Agrarias Finca la Orden-Valdesequera, perteneciente Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Tras el destete a los 45 días los animales fueron agrupados en distintos lotes por edad y peso vivo. Se alojaron en corrales de 1,5x1,5 metros, en una zona sombreada, con agua fresca ad libitum y alimentados con una adaptación progresiva a las dietas de estudio. Los lotes de estudio fueron: Lote C0: corderos alimentados con pienso comercial y paja de cereal. Lote C1: corderos alimentados con pienso comercial y subproducto en sustitución de la paja.

El subproducto se ofreció a los animales en forma de ensilado, como fuente de fibra larga en contraposición con la paja usada habitualmente. Se utilizó un 5% de paja de cereal como base física para hacer el ensilado. El sistema de fabricación fue mediante microsilos enfardados. El contenido en proteína y fibra de las dietas fue: pienso comercial :16.25, 7.97%, ensilado de tomate: 14.54, 44.09% y paja 4.75, 41.55% respectivamente.

Semanalmente, se controló el peso individual de los corderos, así como el consumo total de pienso y suplementos de cada lote, determinándose las curvas de crecimiento, consumo, ganancia media diaria e índice de conversión. Cuando el peso medio del lote alcanzó el peso previsto de sacrificio (36-38 kg), los animales se trasladaron al matadero. Tras el sacrificio, se tomó el peso de la canal caliente y tras 24 horas de oreo en cámara frigorífica (4°C y 80% HR), se tomó el peso de canal fría. Se clasificaron las canales según conformación (R. CEE nº2137/92) y engrasamiento (R. CEE nº 461/93).

Se valoró objetivamente la coloración de la canal, mediante espectrocolorímetro Kónica Minolta CM600d, determinándose los valores de luminosidad (L*), índices de rojo (a*) y amarillo (b*) a nivel de la pierna, lomo, espalda y en el músculo *Rectus abdominis* y utilizando el espacio de color CIELAB (CIE, 1986). Se tomó el pH de la canal, en el músculo *Longissimus dorsi* (LD) en la media canal izquierda entre L4 y L5.

El LD se dividió en 3 partes iguales para muestrear los días 0, 4 y 8, siendo envasadas en bandejas de polipropileno, con una mezcla de gases 51.03±0.39 y 16.58±1.40% de CO₂ y N₂ como gas de relleno.

Se valoró: pérdidas por envasado, pH, materia seca, cenizas, capacidad de retención de agua, contenido en pigmentos hemínicos, cuantificación de la grasa intramuscular, estabilidad oxidativa (TBARs y grupos tioles), pérdidas por cocinado, textura y TPA. Completándose con los de calidad higiénica o microbiológica siguiendo la metodología oficial. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre los distintos lotes de estudio mediante el paquete estadístico SPSS, v.20. Se presentan los valores medios de cada tratamiento, el error estándar de la media (e.e.m) y las diferencias entre medias establecidas mediante el test de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de crecimiento quedan reflejados en la tabla 1. La duración del cebo (DC) fue similar para los dos lotes de estudio así como la ganancia media diaria (GMD). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Fondevilla y col (1994), donde se alimentaron corderos en fase de crecimiento con subproducto de tomate como suplemento de proteína. Del mismo modo Abdullahzadeh (2012) concluyó que no había diferencia de peso en cabras de raza Markhoz alimentadas con y sin subproducto de tomate.

Tabla 1. Influencia de la dieta en parámetros de crecimiento de los corderos

	C0	C1	EEM	P dieta
PS	36,84	37,50	0,67	0,659
DC	56,89	56,89	0,84	1,000
GMD	0,32	0,33	0,01	0,639
CMD paja o tomate	0,26	0,08	0,02	0,000
CMD pienso	1,03	1,04	0,01	0,430
CMD total	1,29	1,12	0,02	0,000
IC paja o tomate	0,83	0,26	0,08	0,000
IC pienso	3,26	3,23	0,09	0,863
IC total	4,09	3,48	0,14	0,024

PS: peso de sacrificio (kg), DC: días de cebo, GMD: ganancia media diaria (kg), CMD: consumo medio diario (kg/día), IC: índice de conversión.

El CMD de pienso no se vio afectado por la suplementación, no siendo así el CMD de tomate respecto al de paja, siendo menor que la cantidad de paja ingerida por los animales del lote C0. De igual manera el IC del ensilado de tomate fue menor que el de la paja utilizada en C0, indicando así una buena transformación del subproducto. De igual manera, Ben Salem y col (2008), tampoco encontraron diferencias en CMD y GMD, sin embargo difieren con nuestro estudio en el IC, quienes concluyen que el IC de corderos alimentados con subproducto de tomate fue mayor que el de los animales control (1,53 y 1,16, respectivamente). Esto puede ser debido a que ellos no sustituyeron la paja por el tomate, sino que usaron los dos alimentos a la vez y el resultado del IC es la suma de ambos. En la valoración de la canal, la dieta no influyó en ninguno de los parámetros estudiados. Esos mismos resultados fueron obtenidos por Abdullahzadeh (2012), cuando enriquecieron la dieta de cabras hasta un 30 % con subproducto de tomate desecado. En relación a los parámetros físico-químicos relacionados con la calidad y vida útil de la carne, no se observa ningún efecto determinado por la dieta. Sólo se ve afectado el índice a^* y CRA la cual disminuye a medida que transcurren los días de conservación (29.29, 25.63 y 23.79% para los días 0,4 y 8 respectivamente). Los datos referentes a oxidación lipídica y proteica (tabla 2), nuevamente muestran ausencia de efecto debido a la dieta, sin embargo el contenido en MDA se ve afectado por los días de conservación, aumentando considerablemente desde el día D0 al D4.

Tabla 2. Influencia de la dieta y días de envasado en la estabilidad oxidativa.

	Dieta		Día			EEM	P dieta	P día	P dieta*día
	C0	C1	D0	D4	D8				
MDA	0,65	0,39	0,25 b	0,76 a	-	0,07	0,078	0,000	0,850
TIOL	124,83	135,48	136,68	123,63	-	5,81	0,338	0,292	0,814

MDA: mg MDA/kg músculo (oxidación lipídica), TIOL: nmol thiol/mg proteína(oxidación proteica).

Las diferencias de las variables de textura y TPA se deben a los días de maduración (tabla 3). Los valores de elasticidad, cohesividad, masticabilidad y resiliencia, son más bajos el D4.

Tabla 3. Influencia de la dieta y días de envasado sobre la textura y TPA.

	Dieta		Día			EEM	P dieta	P día	P dieta*día
	C0	C1	D0	D4	D8				
PC	25,20	25,76	23,09	27,77	24,39	0,91	0,856	0,130	0,421
FC	7,40	4,90	6,82	4,13	4,32	0,40	0,247	0,073	-
D	0,22	0,20	0,19	0,23	0,21	0,01	0,469	0,412	0,364
E	4,27	5,53	6,21 a	2,98 b	5,44 a	0,41	0,081	0,002	0,731
C	0,64	0,69	0,71 a	0,61 b	0,67 ab	0,01	0,076	0,016	0,162
G	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,01	0,758	0,995	0,310
M	0,75	0,78	1,05 a	0,42 b	0,80 ab	0,01	0,817	0,015	0,612
R	0,44	0,46	0,47 a	0,40 b	0,47 a	0,01	0,487	0,032	0,014

PC: pérdidas por cocinado (%), FC: fuerza de corte (kg), D: dureza TPA 20, E: elasticidad TPA 20, C: cohesividad TPA 20, G: gomosidad TPA 20, M: masticabilidad TPA 20, R: resiliencia TPA 20

Los recuentos de todos los microorganismos estudiados estaban por debajo de lo establecido por ICMSF en carne fresca, no resultando afectados ni por la dieta ni por los días de maduración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullahzdeh, F. (2012). JAS 8(8): 848-852.
- Fondevila, M. y col(1994). SRR. 13, 117-126.
- Guada, J.A. y col. (1986). 37th Annual Meeting of the EEAAP.
- Manterola, D y col, (1999). Ministerio de Agricultura.
- Molina-Alcaide, E. Y col (2009). JAS 87: 1321-1333.
- Patel, B. y col (1971). JAS 41(7):542-545.
- Pérez Baena I.y col (2011). ISSN: 1889-0784. Nº 178.
- Porte, E. y col (1993). Prod. Anim. 18(1-2):55-62.

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA2012-0044-00-00)

INFLUENCE OF TOMATO BY-PRODUCT INTO FEEDING OF MERINO LAMBS ON GROWING AND MEAT QUALITY.

ABSTRACT: This study analysed the effects of feeding lambs with tomato by-product during fattening period, from weaning to slaughter. Twenty merino lambs were assigned into two batches. (C0)(lambs unsupplemented) and (C1)(lambs supplemented).None zootechnical variable is influenced, but with less by-product input in relation to straw, lambs reach slaughter weight at the same time. Carcass evaluation is similar in two cases. Physico-chemical parameters from meat, such as colour, pH, fat content, water holding capacity, dry matter, ash and hematine contents were not affected by supplementation with tomato by-product ($p>0.05$).There were no significant differences in lipid and protein oxidation) values neither in Warner-Bratzler and TPA assay neither in microbiological counts. In this context, tomato by-product supplementation could be potentially used as lambs feeding, since growth, carcass and meat quality is not negatively affected.

Keywords: tomato by-product, lamb, growth, meat quality

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PULPA DE TOMATE EN ENSILADO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA CARNE DE CORDEROS

Sánchez-Baltasar*, R., López-Parra, M.M. y Muñoz-Regalado, B.
Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden-Valdesequera.CICYTEX.
Autovía A-5, km 372 - 06187 Guadajira, Badajoz. *ramiro.sanchez@gobex.es

INTRODUCCIÓN

El uso de subproductos viene siendo utilizado desde hace tiempo en la alimentación de rumiantes tanto por rebajar los coste de alimentación, como por disminuir el impacto ambiental negativo de muchos de estos residuos (Cerisuelo & Piquer, 2009).

En función de los principales cultivos de Extremadura, existen tres fuentes interesantes de subproductos: el alpeorajo de las almazaras, la pulpa de tomate y el bagazo de uva (Coletto et al., 2011). Estos subproductos, además de las características nutritivas básicas (aporte de energía, proteína y minerales) tienen un potencial muy atractivo al ser portadores de sustancias con actividad antioxidantes: compuestos fenólicos en la uvas (Jackson, 2008), y alpeorajo (Fernández et al., 2006) y licopenoides en pulpa de tomate (Shalin et al., 2004).

La pulpa del tomate fresca es el subproducto de las industrias de transformación del tomate. Por su composición química se considera un subproducto húmedo (30,0% MS) con un elevado nivel de grasa (13,3% EE/MS) contenida en las semillas alto contenido en fibra (60,0% FND-47,6 FAD/MS) y moderado en proteína (5,4% Proteína Degradable - 4,32% Proteína Digestible), almacenado también principalmente en las semillas, y una digestibilidad intermedia (Manterola y col.,1999).

El objetivo principal de este estudio es cuantificar los efectos que tienen sobre la composición de ácidos grasos de la carne de los corderos cuyas madres toman en su dieta suplementación con ensilado de pulpa de tomate durante el periodo de gestación-lactancia y sobre los corderos durante el periodo de cebo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se sacrificaron corderos al destete (59 días y 16,8 Kg) cuyas madres fueron suplementadas con ensilado de tomate al 5%, para observar qué efectos provocan sobre la calidad de la grasa en sus crías. Las madres utilizadas en el proyecto proceden del rebaño de raza merina de la finca experimental del Centro de Investigación La Orden-Valdesequera. Los lotes de estudio son: **M0**: madres no suplementadas y **M1**: madres suplementadas durante el último tercio de gestación. Cada uno de estos lotes experimentales estaba formado por 60 animales. La suplementación se realizó según necesidad y estado fisiológico.

Tras el periodo de gestación, al nacimiento hubo dos grupos de corderos, **C0**: corderos nacidos de madres no suplementadas y, **C1**: corderos nacidos de madres suplementadas. Cada lote fue constituido por 10 corderos machos. La comparación de los corderos C0 y C1 determinará el posible efecto que ejerce la suplementación de las madres durante el periodo de gestación y lactancia.

Por otro lado, se plantea la respuesta de los corderos cuando son suplementados con el subproducto estudiado durante el periodo de cebo. Los lotes de estudio planteados fueron, **C00**: corderos procedentes de madres no suplementadas durante la gestación y lactancia, y no suplementados durante el periodo de cebo, **C01**: corderos procedentes de madres no suplementadas durante la gestación y lactancia, y si suplementados durante el periodo de cebo, **C10**: corderos procedentes de madres suplementadas durante la gestación y lactancia, y no suplementados durante el periodo de cebo, **C11**: corderos procedentes de madres suplementadas durante la gestación y lactancia, y también suplementados durante el periodo de cebo. Cada lote de estudio estaba formado por 10 corderos. El periodo de cebo fue 58,5 días.

El procedimiento empleado para la extracción y cuantificación de la grasa intramuscular fue el método de Folch (1957), basado en la extracción del contenido graso de la muestra de carne con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1), y evaporación final del disolvente para cuantificación mediante pesada de la grasa extraída.

La metodología para el análisis de los ácidos grasos de la grasa intramuscular extraída, se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa, previa transesterificación de los ácidos grasos, en cuya identificación se empleó el patrón cromatográfico FAME Mix 37.

Los ácidos grasos considerados fueron los siguientes: C12:0, C14:0, C14:1, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:0, C18:1t, C18:1c, C18:2n6t, C18:2n6c, C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C20:1, C20:3n6, C20:4n6, C22:0, C20:5n3, C22:2, C22:6.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre los distintos lotes de estudio mediante el paquete estadístico SPSS, v.20. Se presentan los valores medios de cada tratamiento, el error estándar de la media (e.e.m) y las diferencias entre medias establecidas mediante el test de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición en ácidos grasos de la grasa del tejido adiposo hace referencia a varios aspectos de interés en la calidad y características sensoriales de la carne. En el estudio realizado, el principal ácido graso de la grasa intramuscular de cordero es el ácido oleico C18:1n9c entre un 30-40% del total de ácidos grasos presentes. Seguido por el C16:0 entre un 17-23%. El tercer ácido graso en abundancia es el C18:0 entre un 12-14% y el cuarto el C18:2n6c entre un 5-14%. Los MUFA fueron por tanto, los ácidos grasos mayoritarios, entre un 30-46%, seguidos de los SFA entre un 35-41%. Finalmente, los PUFA los encontramos entre un 7-24% de los ácidos grasos totales.

En la Tabla 1., podemos observar que el efecto de los corderos cuyas madres han sido alimentadas con o sin suplementos de pulpa de tomate tienen un efecto significativo sobre el % SFA y % MUFA pero no significativo con el % PUFA. Los valores medios de SFA disminuyen (de un 33.36% a un 31,47%) y los MUFA aumentan (de 23,90% a 26,51%), cuando las madres de los corderos destetados han tomado en su dieta pulpa de tomate al 5% en ensilado.

Tabla 1. Influencia de la suplementación de las madres sobre la composición de los ácidos grasos de los corderos sacrificados al destete (media±error típico)

	C0	C1	P dieta
% SFA	33,36±0,80	31,47±0,36	0,039
% MUFA	23,90±1,20	26,51±0,46	0,050
% PUFA	33,16±0,97	33,22±0,63	0,995

En la Tabla 2., se puede ver que el efecto de la dieta con suplemento de ensilado de pulpa de tomate durante el cebo de los corderos, independientemente de si sus madres fueron o no alimentadas con ensilado de pulpa de tomate, no tiene un efecto significativo sobre la composición del perfil de ácidos grasos.

Tabla 2. Influencia de la suplementación de las madres sobre la composición de los ácidos grasos de los corderos tras el periodo de cebo (media±error típico)

	C00	C01	C10	C11	P dieta
% SFA	37,79±0,82	39,08±0,77	38,41±0,63	35,94±1,34	0,12
% MUFA	43,69±1,38	44,66±1,38	45,94±1,22	48,65±1,81	0,11
% PUFA	13,37±1,74	12,30±1,15	11,44±1,45	8,70±0,87	0,12

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cerisuelo,A.; Pique,O. (2009). Subproductos agroindustriales en alimentación animal. En: Aprovechamiento de subproductos tratamientos de residuos de la industria alimentaria y la producción animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.
- Coletto,J.M.; Muslera,E.; González,B.; Pulido,F. (2011). Superficies agrícolas y producciones vegetales. En: La agricultura y la ganadería extremeñas. Informe 2010. Caja Badajoz.
- Fernández,J.; Rodríguez,G.; Rodríguez,R.; Gillen,R, Jiménez,A. (2006). Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas y aceites*, 57(1): 95-106.
- Folch, J., M. Lees and G. A. Sloane. 1957. A simple methods for isolation and purification of total lipids from tissues. *J. Biol. Chem.* 266:497-509.
- Manterola, D; Cerda, D y Mira, J. 1999. Los residuos agrícolas y su uso en la alimentación de rumiantes. Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura. Santiago de Chile.
- Shalin,E.; Savage,G.P; Lister,C.E. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 635.647.

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA2012-00044-00-00).

INFLUENCE OF TOMATO BY-PRODUCT INTO FEEDING OF EWES AND MERINO LAMBS ON FATTY ACID PROFILE

ABSTRACT: This study analysed the effects of by-product supplementation of ewes during pregnancy and lactation on lambs slaughtered at weaning and during fattening period from supplemented or not ewes. The main objective of this study is to quantify the effects on fatty acid composition. The mean values of SFA decreased (from 33.36% to 31.47%) and MUFA increased (from 23.90% to 26.51%), in lambs slaughtered at weaning. Furthermore, it is found that the effect of dietary supplementation of silage tomato pulp during the fattening of lambs has no significant effect on fatty acid composition.

Keywords: lamb, fatty acids, tomato by-product.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE SUBPRODUCTOS INDUSTRIALES DE TOMATE (SIT) SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE CARNE DE CORDERO

Timón¹, M.L., Petróñ¹, M.J., Muñoz-Regalado², B., López-Parra², M.M. y Andrés¹, A.I.

¹Tecnología de Alimentos. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura.

06007 Badajoz. ²Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura,

Instituto de Investigaciones agrarias Finca La Orden-Valdesequera, Guadajira.

*mltimon@unex.es

INTRODUCCIÓN

La industria del tomate genera continuamente grandes cantidades de residuos con las semillas y la piel, a los que se les da el nombre de subproductos industriales de tomate (SIT), que por otra parte contienen prácticamente la misma proporción de factores nutricionales que la materia prima (Alvarado *et al.*, 1999). En la piel del tomate se encuentra la mayor cantidad de los antioxidantes (52%), en mayor proporción que en la pulpa y en las semillas. La actividad antioxidante corresponde a la vitamina C y E, carotenoides y compuestos fenólicos (Strati y Oreopoulou, 2011). Investigaciones recientes se han centrado en el uso de este subproducto como nuevo ingrediente en productos cárnicos (Doménech-Asensi *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de extractos obtenidos de SIT en carne o productos cárnicos no ha sido estudiado hasta el momento. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de extractos de SIT en carne de cordero con el fin de mejorar la estabilidad oxidativa de este producto.

MATERIAL Y MÉTODOS

El subproducto de tomate (SIT) fue proporcionado por "Tomate del Guadiana" y congelado a -80°C hasta la obtención de los extractos. Para la extracción, se añadieron 30 ml de etanol o etilacetato a 3 g de SIT, que fueron homogeneizados y centrifugados a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recogido y filtrado con papel de filtro y el residuo fue extraído nuevamente siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, los dos sobrenadantes fueron combinados y evaporados usando un rotavapor. El sedimento final fue disuelto en 5 ml de agua y congelado (-80°C) hasta su adición a la carne.

Las muestras de carne que se utilizaron procedían del músculo *Longissimus dorsi* de corderos merinos procedentes de la finca Valdesequera y con un peso y edad de sacrificio medio de 121,52±5,6 días y 37,50 ± 2,41 kg, respectivamente. Las piezas fueron loncheadas en secciones de 1,5 mm de grosor que se agruparon aleatoriamente en tres grupos o lotes según su tratamiento posterior: I) Lote control (C): carne con ningún extracto añadido. II) Lote etilacetato (EA): carne con extracto obtenido mediante el uso de acetato de etilo como disolvente. III) Lote de etanol (E): carne con extracto obtenido mediante el uso de etanol como disolvente. En los lotes II y III, se añadieron 0,3 ml de extracto a la superficie de los filetes, extendiéndose uniformemente mediante el uso de una espátula de acero inoxidable. En el caso de las muestras del lote control, se añadió 0,3 ml de agua de la misma manera.

Las muestras de filetes de *Longissimus dorsi* se envasaron en bandejas de polipropileno (130x160x40 mm) y se sellaron con una película de poliéstermetilcelulosa (PLPMC) con una permeabilidad al oxígeno de 114 cm³/m²/24 h. Se introdujo una mezcla de gases en los paquetes que consistía en 51,22±0,97% de O₂ y 17,98±0,40% de CO₂ con N₂ como gas de relleno. Las bandejas se almacenaron a 2±1°C y fueron expuestas a la luz para simular las mismas condiciones que en los lineales de los supermercados. Se tomaron muestras después de 0, 3 y 7 días de almacenamiento en estas condiciones, procediéndose de inmediato al análisis del color. El resto de las muestras se envasaron al vacío y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

El color de la superficie de los filetes fue analizado inmediatamente después de la apertura de los envases. Se determinaron las coordenadas (L*) luminosidad, (a*, rojo±verde) intensidad del color rojo, y (b*, amarillo±azul) intensidad del color amarillo. Los parámetros de color se determinaron usando un colorímetro de reflectancia Minolta CR-300 (Minolta Cámara Co, Osaka, Japón).

El grado de oxidación lipídica se determinó mediante el test del ácido tiobarbitúrico o TBARS (Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico), siguiendo el proceso descrito por Sorensen y

Jorgensen (1996). Una vez terminado el proceso, se llevó a cabo la medición de la absorbancia del sobrenadante a dos longitudes de ondas, 532 y 600 nm, en un espectrofotómetro. Los TBARs se expresaron como mg de malondialdehído (MDA) por kg de muestras usando tetraetoxipropano (TEP) como estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presenta la evolución de los parámetros de color L*, a* y b* en la superficie de las muestras de cerdo de los distintos lotes durante 7 días de almacenamiento en refrigeración (4±1°C).

Tabla 1. Evolución de los parámetros de color L*, a* y b*

Día	Lote	L*	a*	b*
0*	CONTROL	40,55±1,05 ²	19,07±1,25 ¹	8,98±0,66
	ETILACETATO	40,55±1,05 ²	19,07±1,25 ¹	8,98±0,66 ²
	ETANOL	40,55±1,05 ²	19,07±1,25 ¹	8,98±0,66 ²
	P _{lote}	-	-	-
3	CONTROL	45,13±0,64 ¹	13,41b±0,64 ²	8,65b±0,32
	ETILACETATO	42,48±0,85 ²	16,94a±0,34 ¹²	17,70a±0,66 ¹
	ETANOL	45,93±1,48 ¹	13,23b±0,24 ²	17,44a±1,75 ¹
	P _{lote}	ns	***	***
7	CONTROL	47,35±0,81 ¹	9,63±0,76 ³	9,50b±0,41
	ETILACETATO	47,40±1,10 ¹	12,94±1,03 ²	18,36 ^a ±1,35 ¹
	ETANOL	43,95±1,61 ¹²	11,27±1,09 ³	15,65 ^a ±1,27 ¹
	P _{lote}	ns	ns	***

El parámetro luminosidad o L* aumentó significativamente durante el almacenamiento. En cuanto al efecto de la adición de los extractos sobre el color de la superficie de la carne, no hubo diferencias significativas para el valor L* (p>0,05). En otros estudios llevados a cabo en muestras de cerdo y ternera almacenadas en refrigeración a las que se agregó extracto de romero, tampoco se observaron diferencias para L* en comparación con muestras control (Hernández-Hernández *et al.*, 2008). El índice de color rojo (a*) disminuyó significativamente en todos los lotes durante el almacenamiento (p<0,05), siendo más intenso en las muestras Control que en las muestras tratadas con los extractos obtenidos. El valor del parámetro a* depende fundamentalmente del estado químico de la mioglobina, de tal manera que los valores más altos suponen que la proporción de pigmento oxidado sea menor. Mientras menor sea el valor de a*, más cantidad del pigmento oxidado hay (López Vázquez y Cap Vanaclocha, 2007). De hecho, el parámetro a* es más bajo en las muestras control después de 7 días de almacenamiento (9,63±0,76), aunque las diferencias no llegaron a un nivel estadísticamente significativo (p>0,05), como sí lo hicieron tras 3 días de almacenamiento. El índice de color rojo en las muestras EA fue el más alto a los 3 y 7 días (p<0,001 y p<0,05, respectivamente). Estos resultados sugieren que el uso de extractos de SIT en la superficie de la carne podría frenar la decoloración de carne fresca hasta cierto punto. Por otra parte, los extractos de etilacetato parecen mostrar una mayor eficacia que el extracto de etanol, lo cual podría estar relacionado con su capacidad antioxidante. De igual manera, se ha comprobado que la adición de pieles de tomate (hasta un 4.5 % peso/peso) aumentó los índices de color rojo en hamburguesas frescas y cocinadas (García *et al.*, 2009). Los valores del índice de color amarillo b* del grupo control (8,98±66) se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del almacenamiento en refrigeración, sin embargo los del lote AE se incrementaron significativamente (p<0,05) hasta 17,70±0,66 después de 3 días de almacenamiento y a 18,36±1,35 después de 7 días, en tanto que los del lote E se incrementaron hasta 17,44±1,75 para descender a 15,6±1,25 después de 7 días. Esta diferencia en el color se podría atribuir al efecto de la adición del extracto de tomate, que contiene pigmentos que podrían aumentar los valores de b* (Fernández-Lopez *et al.*, 2002).

Para valorar los cambios ocasionados por la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento se utilizó el indicador químico TBARs, cuyos valores finales obtenidos se presentan en la figura 1.

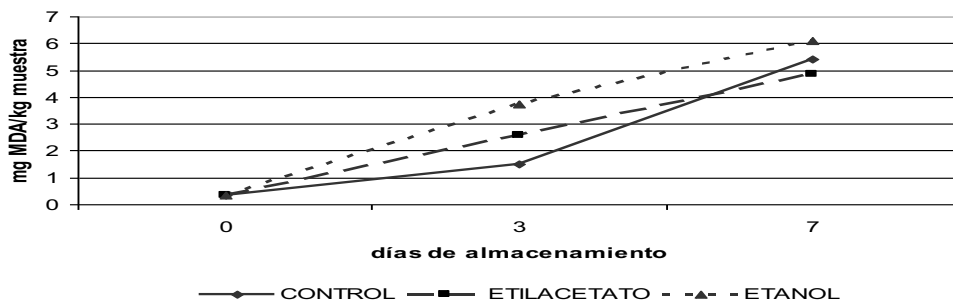


Figura 1. Evolución del TBARs de la carne de cordero durante el almacenamiento en refrigeración ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Los valores TBARs aumentaron significativamente desde $0,35 \pm 0,05$ mg MDA kg^{-1} inicialmente hasta valores finales que variaban desde $4,86 \pm 0,80$ a $6,11 \pm 0,80$ mg kg^{-1} de MDA. Estos valores fueron similares a los observados previamente en la carne de cordero (Gutiérrez y col., 2011). En cuanto al efecto de la adición de extracto, el lote control mostró los valores más bajos para TBARs después de 3 días ($p < 0,05$), pero no hubo diferencias significativas después de 7 días ($p > 0,05$). En vista de los resultados, parece que la adición de extracto de SIT a la carne no ejerce efecto antioxidante frente a la oxidación de lípidos. Por el contrario, la adición de un 10% de pasta de tomate a mortadelas, dio lugar a una mayor estabilidad oxidativa de los lípidos de este producto (Domenech-Asensi y col., 2013). Sin embargo, se encontró una relación entre la oxidación de lípidos y la oxidación de pigmentos, ya que el TBARs mostró una relación negativa con el valor a^* ($R = -0,713$, $p < 0,001$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, M., et al. (1999). Archivos Latinoamericanos de Nutrición 49(2): 138-142.
- Strati, I.F. y Oreopoulou, V. (2011). Food Chem., 129, 747-752.
- Doménech-Asensi, G., et al. (2013). Meat Sci., 93, 213-219.
- Hernández-Hernández E., et al. (2008). Meat Sci., 47, 311-321.
- López Vázquez, R., et al. (2007). Tecnología de Mataderos. Ed. Multiprensa.
- García, M.L., et al. (2009). Meat Sci., 83, 45-49.
- Fernández-López, J., et al. (2002). Sensory and Nutritive Qualities of Food, 67, 2410-2414.
- Gutiérrez, J.I., et al. (2011). International J. Food Sci Tech, 46, 492-499.

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA 2012-0044-00-00)

EFFECT OF TOMATO BY-PRODUCT ON LAMB OXIDATIVE STABILITY

ABSTRACT: Tomato by-products were used to obtain extracts by using organic solvents (ethanol and ethylacetate). The obtained extracts (E and EA, respectively) were applied on lamb meat surface, which was MAP stored and kept in refrigeration for 7 days. Color parameters and lipid oxidation (TBARs) were determined. There were no significant differences for L^* between Control samples and samples with added extracts ($p > 0,05$). Redness (a^*) significantly decreased during storage ($p < 0,05$), more intensely in Control samples than in treated ones. Redness of samples with EA was higher after 3 and 7 days ($p < 0,001$ and $p < 0,05$, respectively). Control batch showed the lowest values for TBARs after 3 days ($p < 0,05$) but differences were not significant after 7 days ($p > 0,05$).

Keywords: tomato by-product, lamb, color, lipid oxidation

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE ACEITE DE LINAZA Y VITAMINA E EN LA DIETA DE LAS OVEJAS CHURRAS SOBRE EL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN LA LECHE Y EN LA CARNE DE LECHAZO.

Gallardo*, B., Guerra-Rivas, C., Mantecón, A.R., Manca, M.G., Nudda, A. y Manso, T.
Área de Producción Animal. Dpto. de Ciencias Agroforestales. ETS Ingenierías Agrarias.
Universidad de Valladolid. Avda. de Madrid s/n. 34004 Palencia.

*beatriz.gallardo.garcia@uva.es

INTRODUCCIÓN

La suplementación de la dieta de ovejas con diferentes fuentes y niveles de grasas insaturadas ha sido señalada como una de las posibles estrategias para enriquecer el contenido de la leche y de la carne de los corderos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) asociados con efectos beneficiosos para la salud (Gómez-Cortés *et al.*, 2009).

Los procesos de biohidrogenación (BH) en el rumen de los ácidos linoleico y linoléico de la dieta implican la formación de isómeros posicionales *trans* del C18:1, siendo el *t-11* C18:1 (ácido vacénico, VA) el mayor isómero *trans* producido (Bauman *et al.*, 2006). Sin embargo, la ingestión de PUFA puede afectar a la población microbiana del rumen, dando lugar a rutas alternativas e incompletas de BH de los PUFA (Bauman *et al.*, 2003), incrementándose así en la leche y en la carne el contenido de otros ácidos grasos (FA) *trans*, asociados con efectos perjudiciales para la salud (Shingfield *et al.*, 2010).

El aumento en el grado de insaturación de la grasa, la hace más susceptible a la oxidación (Salvatori *et al.*, 2004). Para limitar este efecto, está ampliamente extendido el uso de antioxidantes en las raciones de rumiantes, siendo la vitamina E el más utilizado. Por otra parte, algunos estudios han señalado que altas dosis de vitamina E en raciones con alto contenido en aceites muy insaturados podrían afectar a las rutas alternativas de BH de los PUFA a nivel ruminal (Pottier *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la suplementación de la ración de ovejas Churras en inicio de lactación con aceite de linaza y vitamina E, natural o sintética, sobre el contenido en FA intermediarios de los procesos de biohidrogenación ruminal en la grasa de la leche y de la carne de los lechazos producidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 48 ovejas adultas de raza Churra que fueron seleccionadas y alimentadas con la misma dieta hasta el momento del parto. Dos días después del parto las ovejas se asignaron, de forma equilibrada según la producción de leche en la lactación anterior, la prolificidad y el peso a cuatro tratamientos experimentales (12 ovejas y sus 12 corderos/tratamiento) de acuerdo con la ración que recibieron: Control (ración sin aceite de linaza y sin vitamina E), LO (ración con aceite de linaza), LO-Sin (ración con aceite de linaza y vitamina E sintética) y LO-Nat (ración con aceite de linaza y vitamina E natural). La ración de las ovejas del grupo Control consistió en una ración total mezclada (TMR) compuesta por: alfalfa deshidratada (35,5%), harina de soja 44 (15,6%), maíz grano (10,7%), avena (9,39%), cebada (7,11%), pulpa remolacha (7,11%), melaza de caña (4,54%) y corrector vitamínico mineral (Mervigor Ovejas®) (1%). En el tratamiento LO la ración Control fue suplementada con un 3% de aceite de linaza (% FA: C16:0, 6,20%; C18:0, 4,90; C18:1, 21,90; C18:2, 14,80; C18:3, 51,30) y en los tratamientos LO-Sin y LO-Nat con un 3% aceite de linaza y 0,4 g de vitamina E sintética/kg TMR y 0,4 g de vitamina E natural/kg TMR respectivamente. Cada oveja recibió 2,1 kg de materia seca al día de TMR más un 10% de paja de cereales.

Los corderos permanecieron con sus madres desde el nacimiento hasta que alcanzaron el peso de sacrificio, que estuvo prefijado en 12 kg. Tras el sacrificio, faenado y 24 h de oreo se extrajo el músculo *Longissimus dorsi* para el posterior análisis de FA. Durante el período de lactancia se registró semanal e individualmente la producción y composición de la leche y se tomaron muestras individuales. Las muestras de la tercera semana de lactación se utilizaron para el análisis de FA. El perfil de FA de la leche y grasa intramuscular se determinó mediante cromatografía de gases siguiendo el método descrito por Nudda *et al.* (2008). Los datos fueron analizados mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.2. (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Se utilizó el procedimiento CORR del mismo paquete estadístico para establecer correlaciones entre los distintos ácidos grasos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con Manso *et al.* (2011), las diferencias observadas en los FA de la grasa intramuscular de los corderos lechales (Tabla 1) reflejaron las diferencias encontradas en la grasa de la leche, ya que los corderos se alimentaron exclusivamente con leche materna. Las correlaciones significativas observadas entre el contenido de los FA en la leche y la carne confirman estos resultados (Tabla 2).

La inclusión de un 3% de aceite de linaza en la ración de ovejas en inicio de lactación llevó asociado un aumento en la concentración en la leche del ácido vacénico (VA), intermediario de los procesos de BH ruminal de los ácidos linoleico y linolénico (ALA) suministrados con el aceite de linaza (Tabla 1). Los incrementos observados en los niveles de *t*-10 C18:1 y *t*-10, *c*-12 C18:2 en la leche y en la carne de los tratamientos con aceite de linaza (Tabla 1), ponen de manifiesto que son metabolitos de la BH parcial, incompleta y alterada del ácido linoleico que se produce al suplementar la dieta con altos niveles de grasas vegetales insaturadas (Toral *et al.*, 2010).

Los aumentos en el contenido en RA en la leche y en la carne al incluir aceite de linaza en la ración reflejaron los aumentos observados en el contenido en VA, su precursor para la síntesis endógena de RA en la glándula mamaria via Δ^9 -desaturasa (Bichi *et al.*, 2012), como confirma las correlaciones significativas observadas entre ambos FA en la leche y en la carne (Tabla 2). La suplementación de la dieta con aceite de linaza duplicó la concentración de ALA en la grasa de la leche (Tabla 1), a pesar de que algunos autores señalan que su índice de transferencia de la dieta a la leche es muy bajo (Palmquist, 2006).

Ni la inclusión, ni el tipo de vitamina E suplementada dieron lugar a grandes diferencias en el contenido de la mayoría de los FA estudiados en la grasa de la leche y de la carne (Tabla 1). Estos resultados están de acuerdo con los observados por Zened *et al.* (2012) en vacas que han señalado que la suplementación con vitamina E de la dieta no afecta ni limita la BH de los ácidos grasos insaturados en el rumen y contrastan con los resultados obtenidos por Pottier *et al.* (2006). De acuerdo con estos autores, la vitamina E provoca reducciones en los niveles de *t*-10 C18:1 y *t*-10, *c*-12 C18:2, asociados al síndrome de baja grasa en la leche. Sin embargo, la leche del tratamiento con vitamina E sintética (LO-Sin) presentó niveles más altos de *c*-9, *t*-11 C18:2 y *t*-10, *c*-12 C18:2 que la del tratamiento con vitamina E natural (LO-Nat) (Tabla 1).

De los resultados obtenidos en este trabajo se desprende que la suplementación con un 3% de aceite de linaza en raciones de ovejas Churras, cuando se compara con una ración sin aceite añadido, aumenta el contenido VA, *t*-10 C18:1, *t*-10, *c*-12 C18:2, RA y ALA tanto en la grasa de la leche como la grasa de la carne de los lechazos producidos. La suplementación con vitamina E, sintética o natural, tuvo un efecto limitado en la prevención en los cambios en las rutas de BH de los PUFA en las ovejas alimentadas con aceite de linaza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauman, D.E., Corl, B.A. & Peterson, D.G. 2003. En: *Advances in conjugated linoleic acid research*. Vol. 2. pp. 146-173. AOCS Press, Champaign, Illinois (Estados Unidos).
- Bauman, D.E., Mather, I.H., Wall, R.J. & Lock, A.L. 2006. *J. Dairy Sci.* 89: 1235-1243.
- Bichi, E., Toral, P.G., Hervás, G., Frutos, P., Gómez-Cortés, P., Juárez, M. & De la Fuente, M.A. 2012. *J. Dairy Sci.* 95: 5242-5252.
- Gómez-Cortés, P., Bach, A., Luna, P., Juárez, M. & De la Fuente, M.A. 2009. *J. Dairy Sci.* 92: 4122-4134.
- Manso, T., Bodas, R., Vieira, C., Mantecon, A.R. & Castro, T. 2011. *Animal* 5: 1659-1667.
- Nudda, A., Palmquist, D.L., Battacone, G., Fancellu, S., Rassu, S.P.G. & Pulina, G. 2008. *Livest. Sci.* 118: 195-203.
- Palmquist, D.L. 2006. En: *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 2, Lipids. pp 43-92. Springer, New York (USA).
- Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont, E. & Larondelle, Y. 2006. *J. Dairy Sci.* 89: 685-692.
- Salvatori, G., Pantaleo, L., Di Cesare, C., Maiorano, G., Filetti, F. & Oriani, G. 2004. *Meat Sci.* 67: 45-55.
- Toral, P.G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M. & De la Fuente, M.A. 2010. *J. Dairy Sci.* 93: 1604-1615.
- Zened, A., Troegeler-Meynadier, A., Najjar, T. & Enjalbert, F. 2012. *J. Dairy Sci.* 95: 5916-5926.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León

(RTA2010-0068-C02-02 y VA196A11-2) y realizado dentro de un convenio de Colaboración entre la Diputación de Palencia y la Universidad de Valladolid.

Tabla 1. Contenido en FAs intermediarios en la grasa de la leche y de la carne

	Tratamientos				P valor
	Control	LO	LO-Sin	LO-Nat	
Leche					
t-10 C18:1	0,46 ^a	3,52 ^b	2,37 ^{ab}	3,47 ^b	*
t-11 C18:1 (VA)	1,16 ^a	3,55 ^b	4,66 ^b	3,28 ^b	***
c-9, t-11 C18:2 (RA)	0,46 ^a	1,31 ^{bc}	1,46 ^b	0,97 ^c	**
t-10, c-12 C18:2	0,01 ^a	0,05 ^{bc}	0,07 ^b	0,03 ^{ac}	*
C18:3 n-3 (ALA)	0,52 ^a	1,08 ^b	0,98 ^b	0,89 ^b	***
SFA	69,84 ^a	60,54 ^b	62,40 ^b	60,63 ^b	**
MUFA	25,08 ^a	31,40 ^b	29,65 ^b	32,18 ^b	*
PUFA	5,07 ^a	8,06 ^b	7,95 ^b	7,20 ^b	***
Grasa Intramuscular					
t-10 C18:1	0,30 ^b	1,00 ^{ab}	1,13 ^a	1,38 ^a	†
t-11 C18:1 (VA)	0,67 ^b	3,09 ^a	3,10 ^a	3,66 ^a	***
c-9, t-11 C18:2 (RA)	0,50 ^b	1,62 ^a	1,54 ^a	1,63 ^a	***
t-10, c-12 C18:2	0,00 ^b	0,05 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	***
C18:3 n-3 (ALA)	0,62 ^b	0,97 ^a	1,21 ^a	1,05 ^a	**
SFA	48,60 ^a	45,51 ^{ab}	41,97 ^c	45,20 ^{bc}	**
MUFA	38,62 ^b	42,30 ^a	41,60 ^a	42,22 ^a	†
PUFA	12,78 ^b	12,19 ^b	16,43 ^a	12,58 ^b	*

† $P < 0,10$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Tabla 2. Correlaciones entre FAs intermediarios de la grasa de la leche y de la carne

	Leche			Grasa Intramuscular					
	t-10 C18:1	VA	RA	t10,c12 C18:2	ALA	t-10 C18:1	VA	RA	t10,c12 C18:2
Leche									
t-11 C18:1	-0,23								
c-9, t-11 C18:2	-0,22	0,85***							
t-10, c-12 C18:2	-0,41	0,90***	0,87***						
C18:3 n-3	0,65**	0,31	0,36	0,26					
Intramuscular									
t-10 C18:1	0,60*	0,21	0,06	-0,10	0,44				
t-11 C18:1	0,50*	0,52*	0,27	0,33	0,70**	0,45			
c-9, t-11 C18:2	0,41	0,61**	0,48*	0,48*	0,72**	0,35	0,94***		
t-10, c-12 C18:2	0,54*	0,47	0,25	0,29	0,67**	0,41	0,96***	0,93***	
C18:3 n-3	0,13	0,62	0,36	0,48*	0,51*	0,30	0,74***	0,75***	0,74**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF LACTATING CHURRA EWES WITH LINSEED OIL AND VITAMIN E ON TRANS MILK AND MEAT FATTY ACIDS

ABSTRACT: Forty-eight Churra with their new-born lambs were used to study the effects of supplementing diets with 3% of linseed oil and vitamin E, synthetic or natural, on milk and meat fatty acid. Linseed oil caused an increase in VA, t-10 C18:1, RA, t-10, c-12 C18:2 and ALA in milk and intramuscular fat compared to the Control. Neither the addition of vitamin E to the LO diets nor the type of vitamin E did influence significantly the majority of milk fatty acids compared with the LO diet alone.

Keywords: trans fatty acid, milk, meat, biohydrogenation

MODIFICACION DE LA CALIDAD DE LA CARNE DE POLLO DE PRODUCCION ECOLÓGICA DEBIDA A LA ADICION DE MOLTURA DE AJO (ZooAllium®).

Revilla¹, I., Martín², P., Miralles³, A., Otal⁴, J., Palacios⁵, C., Alvarez⁵, S., León³, L. y Cubero³, M.J.

¹Area de Tecnología de los Alimentos. EPS de Zamora. Universidad de Salamanca ²JR Suárez Monedero, SL, Las Pedroñeras, Cuenca; ³Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia; ⁴Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. ⁵Area de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales, Universidad de Salamanca.

* irevilla@usal.es.

INTRODUCCIÓN

La utilización de compuestos naturales como promotores del crecimiento está recibiendo un creciente interés en los últimos años debido a las numerosas críticas que ha despertado el uso de antibióticos con esta finalidad (Iji *et al.*, 2001). Por otro lado, este tipo de prácticas está prohibida en la producción ecológica. Entre estos compuestos naturales, la adición de ajo (*Allium sativum*) a las dietas de pollos en diferentes formas, pasta, aceite esencial, polvo fermentado, ha demostrado tener un efecto positivo en la reducción del colesterol en sangre y hepático, en el descenso de triglicéridos y en la reducción del estrés oxidativo (Qureshi *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 2009; Ao *et al.*, 2011, Issa y Abo Omar, 2012). Sin embargo, el efecto de la suplementación con ajo sobre las características de la calidad de la carne ha sido menos estudiado, sin bien apuntan hacia una mejora de las mismas. Así, se encuentra que la inclusión de polvo de ajo aumentó el extracto seco, la proteína total y el contenido en grasa total (Issa y Abo Omar, 2012) disminuyó la dureza instrumental, la oxidación y el pH (Kim, *et al.*, 2009, Ao *et al.*, 2011). Estos estudios también apuntan a que la adición de ajo no afectó a otros parámetros tales como la capacidad de retención de agua o las pérdidas por cocción a pesar de la modificación significativa del pH (Kim *et al.*, 2009) ni al color de la carne (Ao *et al.*, 2011). El ajo es rico en compuestos antioxidantes tales como compuestos sulfurados y polifenoles (Gorinstein *et al.*, 2005; Ly *et al.*, 2005) los cuales podrían pasar a la carne tal y como se ha descrito para otros compuestos (Jung *et al.*, 2010), aumentado así la capacidad antioxidante y el contenido fenólico. Algunos de estos trabajos han encontrado que el efecto es dosis dependiente encontrándose únicamente un efecto positivo para las dosis más altas (Ao *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo fue estudiar la repercusión que tiene sobre la calidad de la carne de pechuga de pollo de producción ecológica la inclusión en su dieta de una dosis alta ajo molido Zooallium®. Este producto había dado muy buenos resultados en la promoción del crecimiento y en la inhibición del crecimiento bacteriano (Miralles *et al.*, 2014), pero se desconocía su efecto sobre la calidad de la carne. Para ello se analizaron tanto parámetros físico-químicos como como color y textura instrumental.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en gallinero en producción ecológica con pollos de raza "Tricolor catalana". Los animales fueron introducidos con 1 día de edad y fueron separados en dos lotes idénticos según el nivel de moltura de ajo ZooAllium® (JR Suárez Monedero S.L., Las Pedroñeras, Cuenca) incluido en la dieta. La selección de los animales para los dos tratamientos experimentales fue completamente al azar. El grupo control (N=16) recibió una ración de cereales (49% de trigo y 24% de cebada) y de leguminosas (24% de vezas) de producción ecológica, un 3% de corrector vitamínico-mineral y carbonato cálcico. El Grupo Tratado (N=16) recibió la misma dieta con la suplementación del 2% de moltura de ajo. Tras el sacrificio de los animales a los 66 días de vida de acuerdo con las normas de bienestar animal, se procedió a la extracción de las pechugas que fueron congeladas con CO₂ sólido y trasladadas al Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la EPS de Zamora donde se procedió a su conservación a -20°C hasta su análisis. La descongelación se llevó a cabo a 4°C durante 12h. Los análisis físico-químicos que se realizaron fueron medida de pH con pH de punción, color en superficie tras una hora de exposición al aire determinándose los parámetros L*a*b* usando un observador de 10° y el iluminante D₆₅ en el espacio CIELab El equipo usado fue MiniScan XEPlus (Hunter Lab). El contenido en grasa se determinó por extracción en éter (AOAC, 1990), la humedad en estufa (ISO, 1973),

las cenizas por incineración en mufla a 550°C (ISO R-936), y la capacidad de retención de agua se estimó mediante la medida del jugo exprimible (Grau y Hamm, 1953). Los polifenoles totales se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteaus y la capacidad antioxidante (TEAC) mediante el método espectrofotométrico que se basa en la capacidad reductora del ion ABTS⁺ sobre el extracto acuoso obtenido tal y como describe Jung *et al.*, (2010).

Para la estimación de las pérdidas por cocción y el análisis de textura se procedió a cocinar las muestras envasadas en bolsas de plástico y sumergidas en un baño de agua a 75°C hasta alcanzar una temperatura centro pieza de 70°C. Una vez alcanza esta temperatura, las muestras fueron enfriadas en corriente de agua hasta que alcanzaron los 15°C, sacadas de las bolsas y pesadas. Las pérdidas por cocción se estimaron como la diferencia de peso antes y después del cocinado. El análisis de textura se realizó en porciones de 1x1 de sección y 3 cm de longitud usando el texturómetro TX-T2iplus (Stable Micro Systems) equipado con una sonda Warner-Bratzler.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la inclusión de un 2% de Zooallium® en las dietas de pollos ecológicos produjo una disminución significativa de la humedad, lo que es coherente con el aumento del extracto seco observado por Issa y Abo Omar (2012). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado por estos autores el contenido de grasa total en el músculo no sólo no aumentó sino que experimentó un descenso significativo. Esto podría ser debido al descenso del contenido de grasa, en concreto de triglicéridos, en sangre que se ha encontrado en la mayor parte de trabajos previos (Kim *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2009; Ao *et al.*, 2011, Issa y Abo Omar, 2012).

El pH de la carne de los pollos alimentados con moltura de ajo fue ligeramente mayor a la del control al contrario de lo encontrado por Ao *et al.*, (2011), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Debido a ello el jugo exprimible, es decir los microlitros de agua exudados por presión, fueron más bajos ($p=0.067$) en el caso de la carne de los pollos tratados, es decir que su capacidad de retención de agua fue mayor. Este resultado se correlaciona con las menores pérdidas por cocción de este grupo siendo la diferencia tampoco estadísticamente significativa. Los resultados previos relativos a este parámetro (Kim *et al.*, 2009; Ao *et al.*, 2011) habían mostrado la misma tendencia y al igual que en este trabajo estos autores no encontraron que las diferencias fueran estadísticamente significativas.

En relación al color instrumental de la carne, se encontró una disminución ($p=0.083$) de la luminosidad junto con un aumento del rojo y del amarillo. Los ensayos realizados con polvo fermentado mostraron una ligera tendencia al aumento del amarillo (b^*) a dosis intermedias y del rojo (a^*) a dosis altas (4g/kg) pero sin diferencias significativas (Ao *et al.*, 2011). Parece pues, que la adición de ajo en polvo produjo un ligero oscurecimiento de la carne de los animales ecológicos.

La textura instrumental mostró una tendencia a valores más bajos de fuerza de corte, correlacionada con sus menores pérdidas por cocción, pero a diferencia de lo encontrado en el trabajo de Kim *et al.*, (2009) las diferencias no fueron significativas. Estos autores apuntaban a un efecto tenderizante del bulbo de ajo y que este fue dependiente de la dosis. En el presente estudio la ausencia de significación pudo ser debida al incompleto desarrollo de los animales ecológicos en el momento de sacrificio.

Por último se observa un ligero aumento de los polifenoles totales en la carne pero al igual que en el caso de la actividad antioxidante las diferencias no fueron significativas, lo que contrasta con la menor oxidación de la grasa estimada por el método TBARS indicada previamente por varios autores (Kim *et al.*, 2009, Ao *et al.*, 2011).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ao, X., Yoo, J.S., Zhou, T.X., Wang, J.P., Meng, Q.W., Yan, L., Cho, J.H. & Kim, I.H. 2011. *Livest. Sci.* 141: 85-89.
- Gorinstein, S., Drzewieki, J., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Najman, K. & Jastrzebski, Z. 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2726 –2731.
- Grau, R. & Hamm, R. 1953. Cited by Hamm, R. (1986). *Functional properties of the myofibrillar system and their measurements*. In: P.J. Bechtel (Ed.), *Muscle as food* pp. 135-199. Orlando, FL; Academic Press.
- Iji, P.A., Saki, A. & Tivey, D.R. 2001. *British Poultry Sci.*, 42, 505-513.
- Issa, K.J. &

Abo Omar, J.M. 2012. Open J. Anim. Sci. 2 (2): 62-68. • Kim, Y.J., Jin, S.J. & Yang, H.S. 2009. Poultry Sci. 88: 398-405. • Jung, S., Choe, J.H., Kim, B., Yun, H., Kruk, Z.A. & Jo, C. 2010. Meat. Sci. 86: 520-526. • Ly, T.N., Hazama, C., Shimoyamach, M., Ando, H., Kato, K. & Yamauchi R. 2005. J. Agric. Food Chem. 53: 8183-8189. • Miralles, A., Ota, J., Palacios, C., Martín, P., León, L., Cubero, M.J. (2014). XIX simposio nacional de Avedilla. p. 65. 13 y 14. Zaragoza. • Prasad, R. Rose, M.K., Virmani M., Garg, S.L & Puri, J.P. 2009. Int. J. Poultry Sci. 8 (3): 270-276, 2009. • Qureshi, A.A., Abuirmeileh, N., Din, Z.Z., Elson, C.E. & Burger, W.C. 1983. Lipids, 18, 343- 348.

Agradecimientos:

A Arturo Sócrates de la granja avícola "Guerra" del pollo campesino ecológico, por su colaboración y disposición en el presente trabajo.

Tabla 1. Valores medios y desviaciones típicas de los parámetros físico-químicos determinados.

Parámetro	Control		Zooallium® 2%		Significación
	Media	σ	Media	σ	
Humedad	73,91	0,47	73,24	0,92	0.009
Grasa	1,57	0,25	1,16	0,36	0.000
Cenizas	1,79	0,14	1,76	0,06	ns
pH	5,56	0,12	5,61	0,15	ns
Jugo exprimible	23,83	6,57	21,15	4,12	ns
Pérdidas por cocción	7,11	2,13	6,89	1,43	ns
L* (luminosidad)	58,01	3,33	54,62	9,48	ns
a* (rojo)	5,46	1,09	6,46	0,99	0.001
b* (amarillo)	16,44	3,53	18,57	3,95	0.037
Dureza (WBSF)	33,30	18,16	28,92	18,39	ns
Polifenoles totales	0,39	0,07	0,45	0,10	ns
TEAC (ABTS)	41,65	6,51	37,39	6,96	ns

MODIFICATION OF THE CHICKEN MEAT QUALITY FROM ORGANIC PRODUCTION DUE TO THE ADDITION OF GROUND GARLIC (ZooAllium®).

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the effects of dietary supplementation with ground garlic on breast meat quality in broilers. A total of 32 "Tricolor catalana" were fed either a control diet (based on wheat and barley) or the control diet supplemented with 2% of ground garlic for 66 days. Dietary supplementation resulted in significantly lower moisture ($p < 0.01$) and total fat content ($p < 0.001$) together with a higher red (a^*) ($p = 0.001$) and yellow (b^*) ($p < 0.05$) meat color in chicken muscle compared with muscle from control diet. The inclusion of ground garlic led to decreased meat hardness (Warner Bratzler Shear Force), expressible juice and cooking losses although for this parameters the differences were not statistically significant perhaps due to the incomplete development of the animals at the moment of the slaughter. No effects were observed ($p < 0.05$) for ash, pH, total polyphenol content or antioxidant activity. This results suggest that supplementing broiler chicken diets with garlic can produce darker meat but can enhance eating quality due to the lower fat content and the higher water holding capacity and lower hardness.

Keywords: garlic powder, broiler chicken, meat quality, organic production

EFFECTO DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE UVA SOBRE EL COLOR, LAS PROPIEDADES SENSORIALES Y LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE CARNE DE VACUNO ENRIQUECIDA CON CLA

Gómez*, I., Mendizábal, J.A., Marin, R., Sarries, M.V., Insausti, K., García, S., Ruiz, M., Purroy, A. y Beriain, M. J.

ETSIA. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía, 3006 Pamplona.

*inma.gomez@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

La carne y los productos cárnicos, en general, son esenciales en la dieta de los países desarrollados y sus propiedades saludables pueden ser mejoradas aumentando el contenido de los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA). Sin embargo, estos ácidos grasos pueden acelerar la aparición de la rancidez y los malos olores en la carne (St. Angelo et al., 1990). Además, si la carne es picada se favorece el deterioro del color y la oxidación lipídica. Ya que el color y la estabilidad a la oxidación son muy importantes para su vida útil, el uso de antioxidantes resulta necesario. El extracto de semilla de uva (ESU), rico en polifenoles, es un tipo de antioxidante natural que, además de sus propiedades antioxidantes, proporciona efectos beneficiosos para la salud humana (Gharras, 2009). El uso del ESU podría ayudar a mejorar la vida útil de la carne picada enriquecida con CLA, ofreciendo así un producto más competitivo en el mercado. El objetivo del presente estudio fue estudiar el efecto del ESU sobre el color, las propiedades sensoriales y la estabilidad oxidativa de la carne de vacuno enriquecida con CLA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó carne enriquecida con CLA, proveniente de terneros Holstein alimentados con una dieta convencional enriquecida con un 2% de CLA (Albertí et al., 2013). La formulación general del producto cárnico se basó en el empleo de 98% de carne de vacuno, 2% de cloruro sódico y antioxidante. Se establecieron cuatro tratamientos (dos lotes por tratamiento) de hamburguesas de carne de vacuno enriquecida con CLA, según la dosis de ESU (mg ESU/kg carne): E0 (0), E1 (500), E2 (1250) y E3 (2500). La carne fue picada, luego mezclada con ESU (0, 500, 1250 y 2500 mg ESU/kg carne) y sal (2%). Se prepararon piezas de 100 g aproximadamente que se colocaron en bandejas, se cubrieron con película plástica permeable al oxígeno y se depositaron en un expositor a 2 ± 1 °C y se evaluaron a 0, 1, 3, 6, 8 y 10 días tras su elaboración (exposición a la luz: 10 horas/día). El color instrumental se valoró mediante la determinación de medidas Cie L*a*b* usando un colorímetro Minolta CM 2002. La estabilidad oxidativa de la grasa se evaluó mediante el método de destilación para la determinación cuantitativa del malonaldehído (Tarladgis et al., 1960). Un panel entrenado de 15 panelistas, mediante una escala lineal no estructurada de 15 cm, evaluó la decoloración del color visual (0 cm = rojo brillante, 15 cm = marrón) y la degradación del olor (0 cm = no se detectan malos olores, 15 cm = malos olores) de las hamburguesas. La puntuación de 7,5 cm se estableció como el valor umbral a partir del cual la decoloración y los malos olores comienzan a ser perceptibles y ya no se exhiben atributos de color y olor propios de carne fresca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el efecto del tiempo y de la adición de ESU sobre los niveles de TBARS, expresados como mg malonaldehído/kg producto. El efecto de la dosis resultó ser significativo ($p \leq 0,01$) para los dos días analizados, siendo el tratamiento sin antioxidante (E0) el más oxidado, pasando de 0,31 a 1,62 tras diez días de almacenamiento refrigerado. El ESU fue muy eficaz en las tres dosis suministradas, previniendo la oxidación de la grasa del producto. Otros estudios también han confirmado que el ESU retrasa la formación de TBARS en carne cruda y cocinada (Ahn et al., 2004, 2007; Bañón et al., 2007). No se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos en función de la concentración de ESU adicionada (500, 1250 y 2500 mg ESU/kg carne).

En general, en todos los tratamientos las coordenadas de color (L*a*b*) se han visto afectadas muy significativamente ($p \leq 0,001$) por el tiempo, disminuyendo sus valores desde el inicio (figura 2). Estos resultados corroboran la oxidación de los pigmentos durante el

almacenamiento refrigerado de los productos cárnicos (Faustman et al., 2010). La dosis de ESU no ha dado lugar a diferencias significativas ($p>0,05$) en las tres coordenadas de color, excepto en los días 3 y 8 en la coordenada a^* y a partir del día 6 en la coordenada b^* . Algunos autores afirman que el ESU afecta negativamente al color (Rojas y Brewer, 2007), mientras otros opinan que las dosis altas mantienen el rojo característico de la carne (Carpenter et al., 2007). En las hamburguesas del presente estudio, elaboradas con carne enriquecida con CLA, se puede observar que ha habido una menor variación del color inicial en el tratamiento con mayor dosis de ESU (2500 mg ESU/kg carne).

La evaluación sensorial de los atributos de olor y color cambió significativamente ($p\leq 0,001$), de forma que las puntuaciones fueron aumentando con el transcurso del tiempo (figura 3), reflejo de la degradación que sufrieron los atributos evaluados. Por otra parte, la dosis no ha influido de manera significativa ($p>0,05$) en el olor ni en el color. En este sentido, Rojas y Brewer (2008) tampoco encontraron diferencias en el color visual ni el olor entre el control y los tratamientos con ESU en carne de vacuno congelada durante cuatro meses. La aparición de malos olores y el oscurecimiento del color comenzó a ser perceptible en el día 3 (7,5 cm), lo que restringiría la vida útil de estos productos hasta tres días, coincidiendo con los resultados de Lavieri y Williams (2014).

Se puede concluir, por tanto, que la dosis más baja de ESU (500 mg ESU/kg carne) sería suficiente para prevenir la oxidación lipídica de la carne de vacuno enriquecida con CLA sin afectar negativamente a sus características físicas y sensoriales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, J., Grün, I.U. & Mustapha, A. 2004. *J. Food Protect.* 67(1): 148–155.
- Ahn, J., Grün, I.U. & Mustapha, A. 2007. *Food Microbiol.* 24(1): 7–14.
- Albertí, P., Gómez, I., Mendizabal, J.A., Ripoll, G., Barahona, M., Sarriés, V., Insausti, K., Beriain, M.J., Purroy, A. & Realini, C. 2013. *Meat Sci.* 94(2): 208–214.
- Bañón, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M.D. & Price, A. 2007. *Meat Sci.* 77(4): 626–633.
- Carpenter, R., O'Grady, M.N., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, N.M. & Kerry, J. P. 2007. *Meat Sci.* 76(4): 604-610.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. & Suman, S. P. 2010. *Meat Sci.* 86(1): 86–94.
- Gharras, H. 2009. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44(12): 2512-2518.
- Lavieri, N., & Williams, S.K. 2014. *Meat Sci.* 97(4): 534–541.
- Rojas, M.C. & Brewer, M.S. 2007. *J. Food Sci.* 72(4): S282–S288.
- Rojas, M.C. & Brewer, M.S. 2008. *J. Food Quality* 31(2): 173–188.
- St. Angelo, A.J., Crippen, K.L., Dupuy, H.P. & James, C. 1990. *J. Food Sci.* 55(6): 1501-1505.
- Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T. & Dugan, L. 1960. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37(1): 44-48.

AGRADECIMIENTOS. Proyecto financiado por INIA RTA2009-00004-CO2.

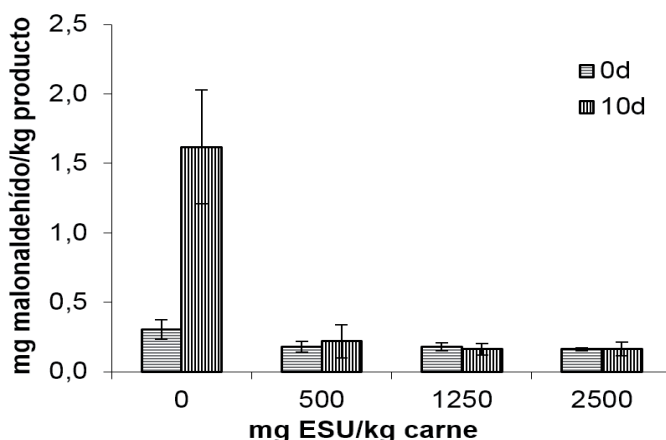


Figura 1. Valores de TBARS (mg malonaldehído/kg producto) de los tratamientos en los días 0 y 10.

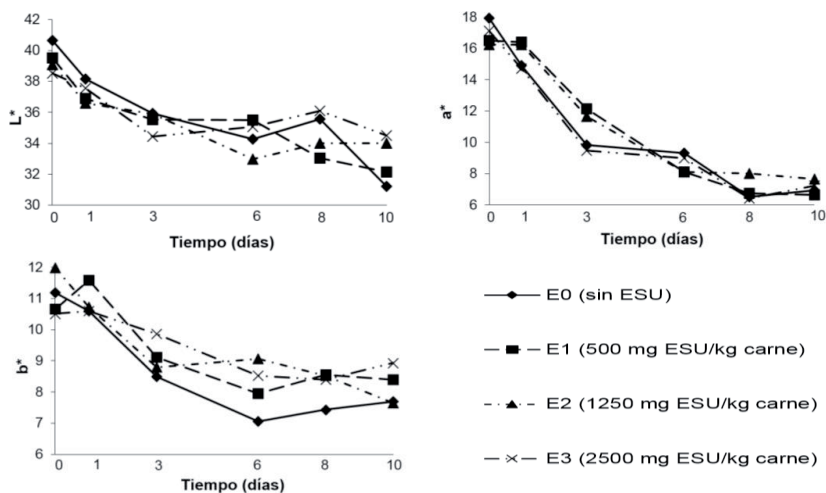


Figura 2. Efecto del extracto de semilla de uva (ESU) sobre las coordenadas de color $L^*a^*b^*$ durante 10 días de almacenamiento refrigerado.

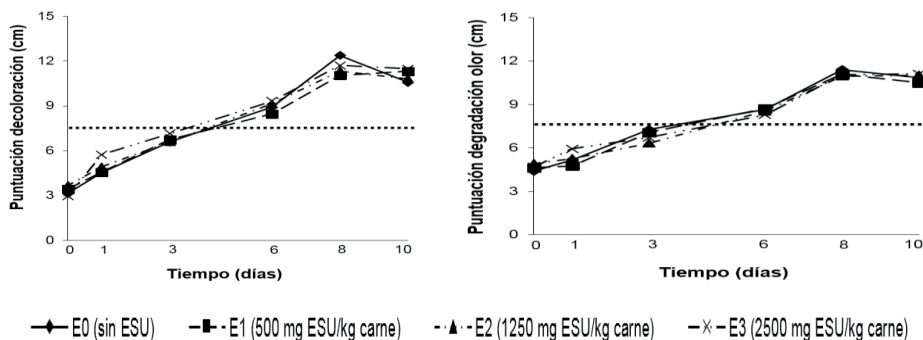


Figura 3. Análisis sensorial de la decoloración del color visual y la degradación del olor de los tratamientos durante 10 días de almacenamiento refrigerado (0 cm: color rojo brillante y no se detectan malos olores; 15 cm: color marrón y malos olores).

EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT ON COLOUR, SENSORY PROPERTIES AND OXIDATIVE STABILITY OF BEEF ENRICHED WITH CLA

ABSTRACT: The effect of grape seed extract (GSE) on colour, sensory properties and oxidative stability of raw beef patties stored at 2 °C for 10 days was studied. Fresh beef was minced, then mixed with GSE (0, 500, 1250 and 2500 mg/kg meat) and salt (2%). The patties were manufactured, stored at 2 ± 1 °C and evaluated the days 0, 1, 3, 6, 8 and 10 after processing. The instrumental colour was determined using the CIELAB system, the oxidative stability was evaluated according to the value of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and the colour and odour were evaluated by a panel of trained judges. All doses of natural antioxidants were effective preventing rancidity of the product. In general, the addition of grape seed extract reduced the values of $L^*a^*b^*$. Sensory variables of colour and odour were greatly influenced by the display time, resulting in off-odour and dark colour. Due to the high efficiency of the natural antioxidant, it can be concluded that the lowest dose would be enough to prevent rancidity in beef enriched with CLA.

Keywords: grape seed extract, beef, CLA, oxidative stability.

EFFECTO DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN, MÚSCULO Y ENVASADO SOBRE LA OXIDACIÓN Y LA EVOLUCIÓN DEL COLOR DE LA CARNE EN LA RAZA AVILEÑA-NEGRA IBÉRICA

Barahona, M.^{1*}, Olleta, J. L.¹, Hachemi, M.A.¹, Sañudo, C.¹, González, M.M.² y Campo, M.M.¹

¹Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza.

²Asociación Española de Raza Avileña-Negra Ibérica, C/ Padre Tenaguillo, 8, 05004 Ávila

*martabm@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Debido a las crisis que han afectado al sector vacuno de carne, y al apoyo que requieren ciertas razas autóctonas españolas por sus menores rendimientos productivos frente a otras razas, resulta necesario que los ganaderos o asociaciones ganaderas se responsabilicen de los eslabones de la cadena alimentaria con el fin de solucionar los problemas en los que se encuentra el sector. La IGP Carne de Ávila está haciendo esfuerzos en buscar la calidad final del producto determinando los puntos críticos a lo largo de la cadena de producción. El cebo típico de sus terneros se realiza con concentrado y paja, pero últimamente se ha alternado con raciones basadas en forrajes y ensilados para hacer que el sistema de alimentación sea menos dependiente de la volatilidad de los precios de las materias primas (Casasús *et al.*, 2012). Además de la alimentación, existen otros puntos críticos en esta cadena, como es el de la conservación del producto final y el incremento de su vida útil, así como la presentación de los diferentes músculos o piezas que se pueden comercializar. El objetivo de este trabajo es analizar el efecto del sistema de alimentación, envasado y tiempo de exposición sobre la calidad de la carne de raza Avileña-Negra Ibérica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 24 machos de raza Avileña-Negra Ibérica divididos en dos lotes de 12 animales. Cada uno de ellos fue alimentado con un tipo de dieta, el grupo CON consumió un pienso comercial y al grupo SILO se le suministró una mezcla de silo de maíz (70%) y pienso comercial (30%). Permanecieron en cebadero alrededor de 250 días y fueron sacrificados con un peso aproximado de 570 kg de peso y 450 días de edad. El despique de los animales se realizó a las 72 horas del sacrificio. Los músculos *Longissimus dorsi* (LD) y *Semitendinosus* (ST) fueron envasados al vacío y enviados a la Facultad de Veterinaria de Zaragoza donde se filetearon con 7 días de maduración. Se estudió el nivel de oxidación y el color de la carne durante el tiempo de exposición en dos tipos de envasados. Para ello dos filetes fueron utilizados inmediatamente para el análisis (exposición 0 días), otros dos fueron envasados en una atmósfera protectora (MAP: 70% O₂ y 30% CO₂) y mantenidos en una vitrina refrigerada (4 ± 1° C) expuesta a luz durante 7 y 14 días y los dos filetes restantes se envasaron al vacío y se conservaron en nevera a 4° C, también durante 7 y 14 días. En todos ellos se realizó la determinación del índice de oxidación lipídica mediante el test de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el color de la carne midiendo la luminosidad (L*), el índice de rojo (a*), el índice de amarillo (b*) y la decoloración (Dec) determinada como la diferencia de la reflectancia a 630 nanómetros (máximo de la mioglobina oxidada) y a 580 nanómetros (máximo de la mioglobina oxigenada).

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS (22.0). Se realizó un modelo lineal general considerando el tipo de alimentación, el tipo de músculo, el envasado y el tiempo de exposición como efectos fijos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tipo de alimentación no afectó significativamente a la oxidación lipídica de la carne, sin embargo, el tipo de músculo, el envasado y el tiempo de exposición tuvieron una fuerte influencia en su enranciamiento. El músculo LD fue el que menos se oxidó aunque no hubo diferencias significativas con el ST. La carne envasada en atmósfera protectora se oxidó mucho más que la carne envasada al vacío, resultado esperable por la alta concentración de oxígeno en las bandejas que favorece una mayor oxidación lipídica, además del efecto prooxidante que tiene la luz de la vitrina expositora (Kim *et al.*, 2010). Los niveles de TBARS aumentaron significativamente con el tiempo de exposición en la carne envasada en MAP,

partiendo de una oxidación a día 0 de 0.092 mg de MDA/kg de carne, llegando a 0.908 a los 7 días y alcanzando los 2.304 a los 14 días (Figura 1), valor que sobrepasa los límites de aceptabilidad del consumidor de 2 mg de MDA/kg de carne (Campo *et al.*, 2006). En el caso de la carne envasada al vacío, la oxidación lipídica se mantuvo muy estable y el valor a día 14 fue de 0.097 mg de MDA/kg de carne.

Por otro lado, se encontró una fuerte interacción entre el tipo de envasado y el tiempo de exposición (Figura 1), a medida que aumentó el tiempo de exposición en la carne envasada al vacío los niveles de TBARS se mantuvieron estables. En el caso de la carne envasada en MAP se observó un incremento de estos niveles con el tiempo de exposición. Además, en el caso del LD, la carne envasada en MAP de los animales del grupo SILO experimentó una menor oxidación que la carne de los animales del grupo CON. Se puede decir que el uso de silo en el sistema de cebo de terneros de raza avileña-negra ibérica puede ralentizar la oxidación lipídica de la carne envasada en atmósfera, quizás por el mayor contenido en antioxidantes naturales que presenta frente al concentrado. No obstante, la mejor forma de evitar su enranciamiento sería manteniéndola envasada al vacío, incluso tras 14 días de envasado.

La evolución del color de la carne envasada en MAP o al vacío, durante 7 y 14 días, se presenta en la Figura 2. El efecto del tipo de músculo, el tipo de envasado y el tiempo de exposición fueron más importantes que la alimentación, puesto que el uso de un pienso tradicional o de silo afectó solo a la luminosidad (L*), mientras que el tipo de músculo, el envasado y el tiempo de exposición también tuvieron influencia en la decoloración (Dec). El color de la carne se mantuvo mucho más estable a lo largo del tiempo en el envasado al vacío que en MAP, tanto en LD como en ST. La carne de los animales del grupo SILO presentó una mayor claridad después de 14 días de exposición, siendo todavía mayor en la carne envasada en MAP. En el músculo ST, esta diferencia no fue tan apreciable, además de ser inferior en la carne envasada en MAP después de 14 días y superior a los 7 días.

La decoloración se vio afectada por todos los efectos, excepto por la alimentación. Valores inferiores de Dec muestran mayor decoloración. En el LD este valor se mantuvo estable en todas las muestras (valores entre 13-14) hasta el día 7 de maduración. A partir de entonces, las muestras envasadas en MAP experimentaron un descenso muy pronunciado alcanzando valores en torno a 2, mientras que en las envasadas al vacío se mantuvo estable hasta el día 14 de maduración, con valores por encima de 14. Sin embargo, en el ST las muestras envasadas en MAP empezaron a decolorarse desde el día 0, bajando 5 puntos a día 7 y hasta 14 puntos a día 14 de exposición. En el caso del ST se observó un descenso de la coloración mayor en la carne envasada en MAP de los animales alimentados con concentrado en comparación con la carne de los animales que consumieron silo de maíz.

Puesto que el color de la carne es el primer atributo por el que los consumidores evalúan la calidad de la carne, para la comercialización de piezas de primera categoría (Lomo), se podría recomendar el uso de silo de maíz en la alimentación y posterior envasado en atmósfera protectora no superior a los 7 días de exposición, no obstante la conservación de la carne al vacío sería la mejor forma de alargar la vida útil de este producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Casasús, I., Ripoll, G. & Albertí, P. 2012. ITEA. 108:2, 191-206 • Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D. & Richardson, I. 2006. Meat. Sci., 72, 303-311 • Kim, Y.H., Huff-Lonergan, E., Sebranek, J.G. & Lonergan, S.M. 2010. Meat Sci, 85, 759-767.

Agradecimientos: Proyecto 20130020000829 financiado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Al personal del departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y a la Asociación Española de la IGP Carne de Ávila.

EFFECT OF FEEDING, MUSCLE AND PACKAGING ON LIPID OXIDATION AND COLOUR EVOLUTION OF MEAT OF AVILEÑA-NEGRA IBÉRICA BREED

ABSTRACT: Twenty-four Avileña-Negra Ibérica bulls were used to evaluate the effect of 2 feeding systems (concentrated and corn silage), 2 types of muscle (*Longissimus dorsi* and *Semitendinosus*) and 2 packaging systems (vacuum and modified atmosphere packaging, MAP) on lipid oxidation and colour evolution of meat. The type of muscle, packaging and storage time had highly influenced lipid oxidation. LD from corn silage fed animals was less oxidized than concentrated fed animals after 14 days in MAP packaging. The interaction between packaging and storage time showed that storage under vacuum conditions was better to prevent lipid oxidation. Lightness was higher in LD from corn silage fed animals after 14 days in MAP. The exposition to oxygen decreased the colour of the meat after 7 days of storage, whilst vacuum conditions kept the colour of the meat throughout the time.

Keywords: feeding, lipid oxidation, beef quality

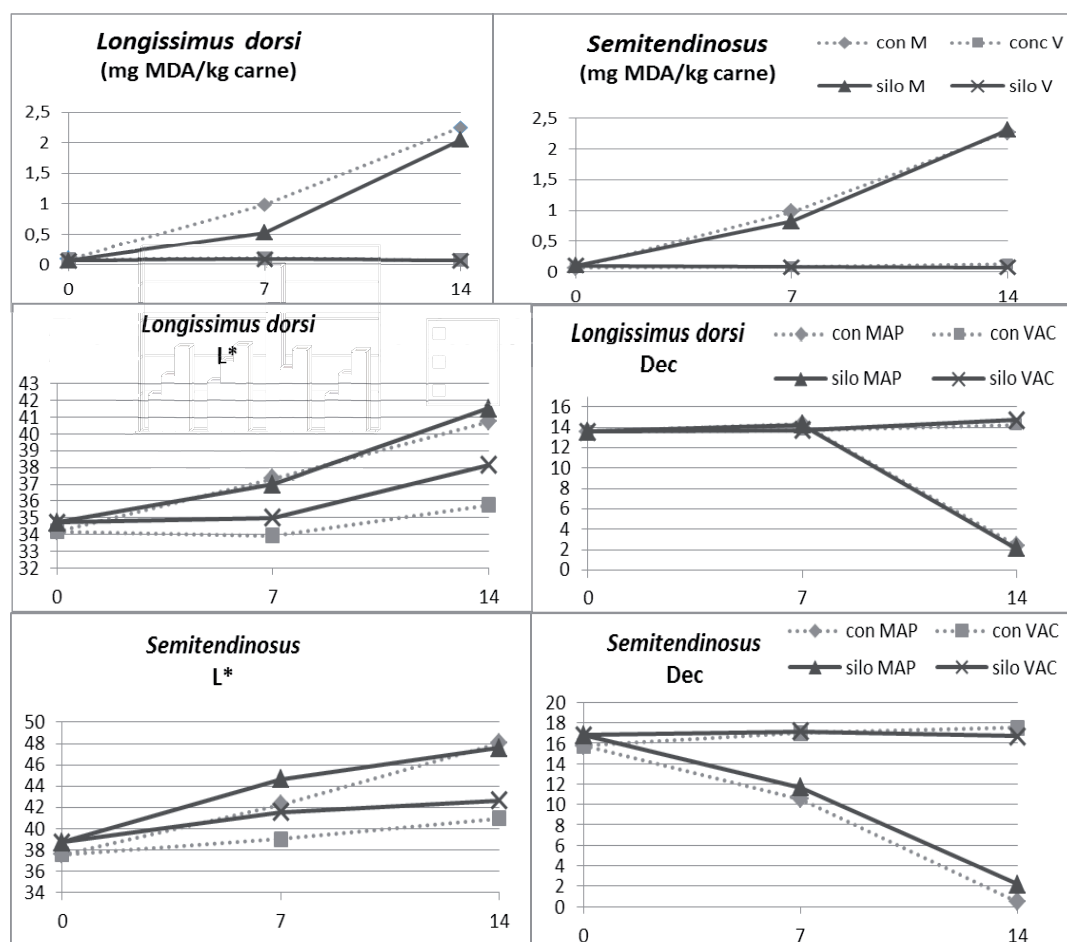


Figura 2. Evolución de la luminosidad (L*) y la decoloración (Dec) de la carne, en dos músculos (LD y ST) y en diferentes envasados (vacío y MAP).

INFLUENCIA DEL SISTEMA DE ALIMENTACIÓN EN EL CEBO SOBRE LA TEXTURA DE LA CARNE DENTRO DE LA IGP CARNE DE AVILA

Hachemi¹, M.A., Campo¹, M.M., Barahona¹, M., Sañudo¹, C., López², J. y Olleta^{1*}, J.L.

¹Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza.

²Asociación Española de Raza Avileña-Negra Ibérica, C/ Padre Tenaguillo, 8, 05004 Avila
*olleta@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El sector vacuno de carne en España está, debido al alto precio de los piensos y al bajo consumo de carne (Casasús *et al.*, 2012), en una marcada situación de crisis. Dentro de este panorama, las razas autóctonas con carne con marca de calidad, especialmente con IGP, como es el caso de la Avileña-Negra Ibérica han podido tener unas expectativas de negocio algo más alentadoras debido a su mayor aceptación en el mercado. Por otro lado, la búsqueda constante de la calidad y la diversificación de la oferta son dos armas que los productores han de utilizar para consolidarse, ganar clientes y con ello, cuota de mercado. En este sentido, es esencial estudiar la influencia del manejo de alimentación, factor que permite la optimización de los costes de producción y la maximización de la rentabilidad, sin perder calidad en el producto. Por otra parte, la textura de la carne, variable durante el proceso de refrigeración, es un aspecto clave de su calidad, al ser la terneza el principal atributo de calidad que valora el consumidor, pero también la capacidad de retención de agua puesto que está directamente asociada con la jugosidad. Por todo ello, el objetivo de este trabajo ha sido analizar el efecto de la utilización de unos niveles elevados de ensilado de maíz, sobre la calidad instrumental de la carne a 7 y 21 días de maduración.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo con 24 añejos, machos, de raza Avileña-Negra Ibérica, la mitad alimentados con pienso y paja y la otra mitad con un 70% de ensilado de maíz y un 30% de pienso. Tras 250 días, los animales fueron sacrificados en el matadero MACRISA en cuatro tandas por lote, con un peso medio de 570 kg y una edad de 450 días. A las 72h post mortem se hizo el despiece y se envasaron al vacío 3 piezas comerciales: lomo (incluyendo el músculo *longissimus dorsi*, LD), redondo (músculo *semitendinosus*, ST) y la falda (músculo *pectoralis profundus* PP). En condiciones de refrigeración se transportaron al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, donde se realizaron los análisis.

La carne se mantuvo envasada por piezas al vacío a 4° C hasta alcanzar 7 días de maduración. En ese momento, se obtuvieron muestras de 3 cm de grosor del LD, ST y PP que se envasaron al vacío. La mitad se congelaron inmediatamente, y la otra mitad se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta alcanzar los 21 días de maduración, momento en el que se congelaron a -18° C.

Para el análisis de textura se utilizó la célula de Warner Bratzler (Campo *et al.*, 2000) con un texturómetro Instron 4301. Las muestras envasadas al vacío fueron cocinadas en un baño de agua a 75° C hasta que alcanzaran una temperatura interna de 70° C. Tras enfriarse se cortaron en prismas rectangulares, de 1 cm² de sección, en la misma dirección que las fibras musculares, recogiendo la fuerza máxima de corte.

Para el análisis de capacidad de retención de agua, se calcularon las pérdidas de agua durante la congelación y el cocinado previo al análisis de la dureza mediante el pesado de las muestras antes y después de cada análisis.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS (22.0) mediante un modelo lineal general con dieta, músculo y tiempo de maduración como efectos fijos. Para las diferencias entre medias se utilizó un test de Duncan con $P \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en la Tabla 1 muestran que el efecto del tipo de alimentación se limitó a la dureza expresada como fuerza máxima de corte ($P=0.021$), ya que la carne de los animales acabados con pienso fue más dura que la de los animales terminados con ensilado de maíz (Tabla 2). No ha sido el caso en el estudio de Casasús *et al.* (2012) quienes encontraron una similitud en la dureza de carne, aunque madurada sólo durante 14 días. Quizás la

diferente genética utilizada pueda explicar parcialmente estos resultados, puesto que dichos autores emplearon hembras de tipo cárnico, como la raza Blanca de Aquitania y cruces de Pirenaica, que implican una velocidad de maduración más rápida que una raza más rústica, como es la Avileña-Negra Ibérica (Campo *et al.*, 1999), lo cual podría disminuir las posibles diferencias debidas a la dieta. Se encontraron también diferencias muy significativas ($P < 0.001$) en la dureza entre los tres músculos y los dos tiempos de envasado-maduración (Tabla 2). En cualquier tiempo de envasado analizado, el músculo ST fue el más tierno y el PP el más duro, característica esperable de una pieza comercial de tercera que requiere cocinados más largos para una mayor solubilización del tejido conectivo que presenta. El músculo cuya terneza más evolucionó a lo largo del envasado fue el LD, tan duro como el PP tras 7 días, pero tan tierno como el ST a los 21 días.

La capacidad de retención de agua medida como pérdidas por descongelación (Tabla 3) no se vio afectada por la alimentación, pero sí por el tipo de músculo y el tiempo de envasado. Las pérdidas por congelación fueron mayores en el PP que en el LD tras 7 días en los animales alimentados con pienso y tras 21 días en los de silo. En ambos casos hubo más pérdidas a los 7 días que a los 21, quizás porque tras 21 días parte del líquido ya se perdió en el envasado. Las pérdidas debidas al cocinado fueron influenciadas exclusivamente por el tipo de músculo, siendo el PP el que menos pérdidas mostró y el ST el que más pérdidas tuvo. Las diferencias fueron especialmente importantes tras 21 días de envasado.

Se puede concluir que los animales alimentados con silo presentan una carne más tierna independientemente del músculo analizado, y que la carne de añojos, dentro de la IGP Carne de Ávila, mejora su textura con envasados de hasta 21 días, frente a 7 días, especialmente en las piezas más nobles como el lomo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Campo, M.M., Sañudo, C., Panea, B., Alberti, P., y Santolaria, P. 1999. *Met Sci* 51, 383-390. • Campo, M.M., Santolaria, P., Sañudo, C., Lepetit, J., Olleta, J.L., Panea, B., y Alberti, P. 2000. *Meat Science* 55: 371-378. • Casasús, I., Ripoll G. y Albertí, P. 2012. *ITEA* 108, 191-206.

Agradecimientos: Proyecto 20130020000829 financiado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, al personal del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y a la Asociación Española de la IGP Carne de Ávila

Tabla 1. Significaciones de los efectos estudiados y sus interacciones en la fuerza de corte y la capacidad de retención de agua (CRA) durante la descongelación y el cocinado

	D	M	T	D*M	D*T	M*T	D*M*T
Fuerza de corte	0.021	<0.001	<0.001	0.467	0.658	0.054	0.965
CRA descong	0.211	0.009	<0.001	0.495	0.244	0.591	0.053
CRA cocinado	0.853	<0.001	0.200	0.425	0.297	0.612	0.210

D: dieta; M: músculo; T: tiempo de envasado.

Tabla 2. Fuerza de corte (kg/cm^2) en tres músculos de animales alimentados con pienso o silo a lo largo del envasado durante 7 ó 21 días (media \pm desviación estándar).

	Pienso		Silo	
	7 días	21 días	7 días	21 días
LD	5.39 \pm 1.22 a	4.15 \pm 0.80 b	4.83 \pm 1.55 a	3.66 \pm 0.69 b
ST	4.13 \pm 0.63 b	3.59 \pm 0.73 b	3.90 \pm 0.53 b	3.63 \pm 0.56 b
PP	5.86 \pm 1.36 a	5.32 \pm 1.48 a	5.07 \pm 0.84 a	4.84 \pm 1.18 a

LD: *longissimus dorsi*; ST: *semitendinosus*; PP: *pectoralis profundus*. Diferentes letras dentro de dieta y tiempo de envasado implican diferencias significativas entre músculos ($P < 0.05$).

Tabla 3. Capacidad de retención de agua durante la descongelación (% de pérdidas) en tres músculos de animales alimentados con pienso o silo a lo largo del envasado durante 7 ó 21 días (media \pm desviación estándar).

	Pienso		Silo	
	7 días	21 días	7 días	21 días
LD	3.45 \pm 1.34 b	3.44 \pm 1.02	5.44 \pm 2.27	2.96 \pm 0.86 b
ST	4.84 \pm 1.57 ab	3.70 \pm 1.61	5.64 \pm 1.96	3.83 \pm 0.90 b
PP	5.63 \pm 2.54 a	4.36 \pm 2.26	4.96 \pm 1.54	4.79 \pm 1.49 a

LD: *longissimus dorsi*; ST: *semitendinosus*; PP: *pectoralis profundus*. Diferentes letras dentro de dieta y tiempo de envasado implican diferencias significativas entre músculos ($P < 0.05$).

Tabla 4. Capacidad de retención de agua durante el cocinado (% de pérdidas) en tres músculos de animales alimentados con pienso o silo a lo largo del envasado durante 7 ó 21 días (media \pm desviación estándar).

	Pienso		Silo	
	7 días	21 días	7 días	21 días
LD	24.80 \pm 3.38 b	26.90 \pm 3.20 b	26.34 \pm 4.16 a	26.91 \pm 2.81 b
ST	31.36 \pm 4.41 a	30.00 \pm 2.08 a	29.03 \pm 1.88 a	30.45 \pm 2.40 a
PP	21.63 \pm 5.14 b	19.97 \pm 2.11 c	20.49 \pm 3.27 b	22.30 \pm 2.75 c

LD: *longissimus dorsi*; ST: *semitendinosus*; PP: *pectoralis profundus*. Diferentes letras dentro de dieta y tiempo de envasado implican diferencias significativas entre músculos ($P < 0.05$).

INFLUENCE OF THE FINISHING FEEDING SYSTEM ON TEXTURE OF PGI “CARNE DE ÁVILA” BEEF

ABSTRACT: The current experiment studied the effect of the use of corn silage or concentrate in the fattening of young bulls of Avileña-Negra Ibérica breed on the toughness of the meat and its water holding capacity in different muscles (*Longissimus dorsi* LD, *Semitendinosus* ST and *Pectoralis profundus* PP) and storage times. The use of the corn silage decreased the toughness of the meat in comparison with the use of concentrate. The muscle ST was the most tender followed by LD, being the least tender the PP. There was no effect of the feeding system on water holding capacity, only the type of muscle and storage time showed some differences.

Keywords: texture, muscles, corn silage.

EFFECTO DEL TIEMPO DE CONGELACIÓN SOBRE LAS PÉRDIDAS DE AGUA Y TEXTURA INSTRUMENTAL DEL SOLOMILLO Y SECRETO DEL CERDO IBÉRICO DE BELLOTA

García-Torres^{*}, S., Pérez-Blázquez, M., Tejerina, D., Martín-Tornero, E., Cabeza de Vaca, M., López-Gajardo, A., Osorio, C. y Prior, E.

CICYTEX (Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura).

A5, km 472. 06187 Guadajira (Badajoz)

*susana.garcia@gobex.es

INTRODUCCIÓN

La carne y productos cárnicos derivados del cerdo Ibérico de bellota son unos de los más apreciados por los consumidores a nivel nacional e internacional. Ser capaces de hacer llegar al consumidor estos productos con la mejor calidad es totalmente necesario. Este tipo de producciones están sometidas a la estacionalidad de la Montanera (Octubre-Febrero), por lo que los productos destinados a su consumo en fresco, son generalmente conservados en congelación (-20°C) para poder así abastecer de forma continua las exigencias del mercado e incluso para su exportación. La congelación es un método de conservación ampliamente aceptado que se utiliza para almacenar carne durante largos periodos de tiempo. El almacenamiento de los cortes de carne para su distribución y venta en la fecha posterior, es una práctica estándar en la industria de la carne. Las ventajas para la industria son claras al haber un aumento del tiempo de almacenamiento, una mayor flexibilidad en el inventario, y un mayor control del producto. La congelación y almacenamiento de carne congelada puede afectar a la propiedades nutritivas, estructurales y físico-químicas.

Por ello uno de los factores a tener en cuenta en el proceso de congelación es el contenido de agua del producto. La congelación y descongelación altera tanto el contenido y como la distribución del agua en el tejido de la carne. Humedad como una característica de calidad en la carne se puede evaluar de varias maneras, incluyendo la pérdida por goteo; por descongelación, pérdida por cocción, la capacidad de retención de agua y contenido de humedad total. La congelación y descongelación influye principalmente en la fracción de agua de la carne. Puesto que el agua está contenida dentro y entre las fibras musculares. La pérdida de agua en la carne implica que aumenta la concentración de los restantes solutos (proteínas, lípidos, vitaminas y minerales), alterando de esta manera la homeostasis del sistema de la carne complejo (Lawrie, 1998) y el valor nutritivo de la carne (McMillin, 2008). La pérdida de agua afecta también a parámetros relacionados con la calidad organoléptica de la carne como puede ser la jugosidad y ternura. Existe una tendencia a pensar que la carne congelada es menos tierna que la no congelada, contrariamente la valoración por un panel sensorial según Lagersted *et al.* (2008), mostró una menor fuerza al corte al valorar una carne congelada frente a una refrigerada. Vieira *et al.* (2009) demostraron que siempre que se realice una adecuada maduración de la carne antes de ser congelada, este efecto se anula. Con este estudio se pretende, evaluar los parámetros de % de grasa intramuscular, las pérdidas de agua y la textura tras diferentes tiempos de congelación en dos piezas de consumo en fresco del cerdo Ibérico de Montanera como son el solomillo y el secreto.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre las piezas comerciales secreto y solomillo, procedentes de 15 cerdos Ibéricos 100% puros de la raza Retinta (Línea Valdesequera) engordados en el sistema de producción tradicional de Montanera hasta alcanzar 150 ± 5 kg momento en el que fueron sacrificados. A las 24 h se retiraron las piezas de estudio, las cuales se dividieron en cuatro partes destinadas a diferentes meses de congelación. La porción correspondiente al mes control fue analizada ese mismo día, las otras porciones fueron envasadas a vacío (bolsas de nylon / polietileno con una permeabilidad al O₂ de 9,3 ml/ m²/24h a 0°C de 90 micras y de 20x20, plastiñi S.L) y congeladas a -20 °C hasta posteriores análisis: T6 (congelación durante 6 meses), T12 (congelación durante 12 meses) y T16 (congelación durante 16 meses).

Los análisis realizados en cada uno de los tiempos marcados fueron la determinación la grasa intramuscular fue determinada mediante el método descrito por Folch *et al.* (1957). Se determinaron las pérdidas de agua, tanto las pérdidas por congelación/descongelación, expresadas como g de agua / Kg de muestra; como las pérdidas por cocinado para lo cual las muestras fueron cocinadas por inmersión en baño de agua caliente a 75 °C durante el tiempo necesario en cada pieza para alcanzar una temperatura interna de 65 °C (Combes y cols., 2003) calculándose los resultados por diferencias de peso expresadas en g de agua/kg de muestra. Se determinó la textura mediante un texturómetro TX2 con una sonda de corte Warner-Bratzler (HDP/BS) estudiando la evolución de la Fuerza máxima (Kg), Firmeza (Kg/sg) y Fuerza total (Kg.sg) con la conservación. La determinación se realizó sobre prismas de carne de 1cm de ancho y después de la cocción en baño de agua caliente a 75 °C durante el tiempo necesario en cada pieza para alcanzar una temperatura interna de 65 °C. Se hicieron 10 determinaciones por muestra. Para estudiar la influencia del tiempo de congelación sobre las pérdidas de agua por cocinado, descongelación y dureza de la carne y en solomillo y secreto de cerdos Ibéricos de bellota se analizaron los resultados mediante el 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 obtenidos se muestran en la Tabla 1. El contenido de grasa intramuscular mostró una diferencia significativa en la pieza de secreto a lo largo del periodo de congelación. Esta pieza se caracteriza por su gran contenido en grasa con una distribución de ésta muy heterogénea. Este resultado es indicativo de esa gran heterogeneidad ya que al separar las diferentes porciones para congelar a diferentes tiempos, el muestreo no ha sido uniforme en cuanto a la GIM. No sucede esto con las muestras de Solomillo, por ser esta pieza cárnica homogénea en su composición. En cuanto a las pérdidas de agua, se van incrementado con el tiempo de congelación encontrándose mayores diferencias en el Solomillo ($p \leq 0,001$) que en el Secreto ($p \leq 0,05$). Estas diferencias podrían ser debidas a las características de las piezas. El solomillo en su composición tiene mayor porcentaje de proteína como consecuencia de su mayor porcentaje en músculo y que es superior al del Secreto como indica Calvo *et al.* (2011). Las pérdidas por congelado no fueron diferentes con el tiempo de congelación en el Solomillo, en cambio de nuevo, la pieza Secreto, mostró diferencias en la cantidad de agua pérdida en el cocinado en función del tiempo de congelación. Estos resultados podrían responder de nuevo a las diferencias en la relación magro/grasa que componían cada una de las muestras congeladas.

Los resultados mostraron una disminución progresiva de la dureza de la carne a lo largo de la maduración (Tabla 1), presentando a mes 16 los valores más bajos de la Fuerza máxima y disminuyendo los valores de dureza a partir de los 12 meses de congelación en el caso del Solomillo y a partir de los 6 meses en el caso del Secreto ($p \leq 0,01$ en ambos casos).

En conclusión, el tiempo de congelación afectó a los parámetros de pérdidas de agua y la dureza el Solomillo y el Secreto de cerdos Ibéricos de Montanera, las mayores pérdidas de agua se produjeron en las piezas congeladas durante largo tiempo (16 meses en el Solomillo y 12 meses en el Secreto) y la dureza disminuyó significativamente a lo largo del tiempo de congelación en ambas piezas.

Tabla 1. Efecto de la congelación/descongelación en la pérdida de agua por congelación/descongelación, cocinado y dureza en el Solomillo y Secreto de cerdos Ibéricos de Montanera.

	Meses de almacenamiento				EEM	P
	control	6	12	16		
Solomillo						
<u>GIM y Pérdidas de agua</u>						

GIM (g/100g músculo)	5,43	5,59	5,53	5,58	0,39	ns	
Pérdidas congelación/descongelación (g/100g músculo)	10,86c	15,57b	15,88b	19,71a	1,57	***	
Pérdidas cocinado (g/100g músculo)	30,63	31,63	32,72	32,35	1,14	ns	
<i>Warner-Braztler</i>							
Fuerza máxima (Kg/cm ²)	5,87a	5,39a	4,59b	4,36b	1,69	**	
Pendiente de firmeza (Kg/sg)	1,18a	1,25a	1,22a	0,65b	0,36	**	
Área Total (Kg.sg)	5,48a	4,96b	4,93b	4,91b	1,58	***	
Secreto							
<i>GIM y Pérdidas de agua</i>							
GIM (g/100g músculo)	19,01b	19,53b	22,25b	35,61a	2,31	***	
Pérdidas congelación/descongelación (g/100g músculo)	3,49b	4,06b	5,73ab	6,41a	0,96	*	
Pérdidas cocinado (g/100g músculo)	14,6b	18,82a	15,76b	19,73a	1,61	**	EEM, error
<i>Warner-Braztler</i>							
Fuerza máxima (Kg/cm ²)	4,34a	3,84b	3,49b	3,12b	2,02	**	
Pendiente de firmeza (Kg/sg)	0,91a	0,91a	0,79b	0,78b	0,26	*	
Área Total (Kg.sg)	6,48a	5,31b	4,83b	3,98c	1,72	***	

estándar de la media. Estadísticos descriptivos expresados como medias. Los valores con las mismas letras (a, b, c) indican subconjuntos homogéneos para $p = 0.05$ de acuerdo a HSD de test. Tukey ns: no significativo ($p > 0,05$). *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Calvo, S., et al., 2011. XIV Jornadas sobre producción animal, tomo II, 682-684; Folch, J. Et al. 1957. J. Bio. Chem, 193, 265-275 ; Lagerstedt, A. et al., 2008. Meat Science, 80, 457–461; Lancaster, PA: Technomic Publishing Inc.; Lawrie, R. A. 1998. In Anonymous (Ed.), Lawrie's meat science (pp. 1–336). (6th ed.). McMillin, K. W., 2008. Meat Science, 80, 43–63 ; Vieira, C. et al., 2009 Meat Science, 83, 398–404.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto LOI1305015/2. Los autores quieren agradecer la participación del personal de la Finca “Valdesequera” en el cuidado y la producción de los animales.

FREEZING WEATHER EFFECT ON WATER LOSS AND TEXTURE OF INSTRUMENTAL AND SECRET OF PORK TENDERLOIN IBERIAN ACORN

ABSTRACT: “Solomillo” and the “Secreto” from Iberian pig Montanera are pieces in high demand by consumers due to its characteristics but these have the disadvantage, of temporality. Frozen storage allows safeguard this situation. The effect of freezing time (6, 12 and 16 months of freezing) on water loss and texture was evaluated. When the freezing time was greater, water losses increased and toughness decreased, though the freezing time differently affected each of the parts.

Keywords: frozen storage, texture, Iberian pig, Montanera.

ESTABILIDAD OXIDATIVA Y MICROBIOLÓGICA DE CARNE DE CERDO ENVASADA EN ATMÓSFERA PROTECTORA PREVIA CONGELACIÓN DURANTE UN AÑO

Alonso¹, V., Bellés¹, M., Calanche^{1,2}, J. B., Roncalés¹, P. y Beltrán^{1*}, J.A.

¹Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, España.

²Departamento de Tecnología de los Alimentos, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, República Bolivariana de Venezuela.

*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). Sin embargo, la experiencia muestra que la carne congelada durante largos periodos de tiempo puede presentar problemas de calidad como pérdida de color y olor y sabor a rancio (Hansen *et al.*, 2004). Por todo ello, es importante conocer y predecir los cambios que sufre la carne mantenida en congelación durante largos periodos, que posteriormente sea descongelada y mantenida en condiciones normales de supermercado: envasada en atmósfera protectora y con iluminación. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar el efecto que el almacenamiento en congelación durante un periodo de un año puede provocar sobre la estabilidad del color y la oxidación, los recuentos microbiológicos y el perfil de ácidos grasos del lomo de cerdo fileteado, envasado en atmósfera protectora y mantenido en condiciones de refrigeración.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio contamos con 18 cerdos machos enteros de cebo de los cruces: a) Pietrain (P)×[(Landrace (LR)×Large White (LW)] y b) P×[LR×Duroc (D)]. Los cerdos fueron alimentados con la misma dieta *ad libitum* y tenían libre acceso a agua durante todo el periodo de cebo. Todos ellos se sacrificaron el mismo día en un matadero comercial, previo aturdimiento con CO₂ y se seleccionaron totalmente al azar canales de cada uno de los cruces de peso medio de canal de 92,26 ± 3,95 kg. La parte craneal de los músculos *Longissimus thoracis et lumborum* procedentes de estos animales se envasó a vacío y se congeló, manteniéndose almacenada durante 12 meses en un congelador a -20 °C. Tras un año, las muestras fueron descongeladas con agua a temperatura ambiente y cortadas cada una de ellas en 5 filetes de un grosor de 2 cm. Estos filetes se envasaron individualmente en atmósfera protectora (70% O₂/30% CO₂). Todas las bandejas fueron almacenadas a 4±1 °C en condiciones de supermercado (1200 lx, 14 h de luz diaria) durante 9 días. En cada uno de los días de análisis se midió el valor de pH con un electrodo de punción, los parámetros de color CIE L*a*b*, la oxidación lipídica (Pfalzgraf *et al.*, 1995) y las pérdidas por exudación. También se determinó el porcentaje de grasa intramuscular (GIM) y el perfil de ácidos grasos [método de extracción Bligh y Dyer (1959); cromatógrafo de gases HP-6890 II; columna capilar SP-2380]; así como los recuentos de aerobios mesófilos y psicrótrofos (Agar PCA, 37 °C/48h, 10 °C/7d) y enterobacterias (Agar VRBD, 37 °C/48h). Los datos fueron analizados por el procedimiento GLM del paquete estadístico IBM SPSS versión 22 (2014) incluyendo en el modelo los diferentes cruces y el tiempo de almacenamiento 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 en almacenamiento. Las diferencias fueron consideradas significativas si P≤0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se muestran los resultados del efecto de los días de almacenamiento en atmósfera protectora (AP) sobre los parámetros de calidad y los recuentos microbiológicos de muestras de carne que previamente habían sido mantenidas en congelación durante un año y después descongeladas. Se encontró (P≤0,05) un leve descenso del pH entre los días 0 y 3 para posteriormente ascender. Además, el valor de L* aumentó (P≤0,01) a lo largo del tiempo de almacenamiento, mientras que el índice de rojo sufrió (P≤0,01) un ligero aumento

del día 0 al día 3 para posteriormente mantenerse estable hasta el día 6, cayendo este valor en el día 9. Esta decoloración que se produce en la carne envasada en AP se debe a una acción combinada de la oxidación del pigmento muscular (Oximioglobina a Metamioglobina) y la oxidación lipídica que se inicia en los fosfolípidos de membrana (Sherbeck *et al.*, 1995) volviéndose la carne de cerdo más clara y, por tanto, disminuyendo el valor a^* y aumentando el valor de L^* a lo largo del tiempo.

Tabla 1. Medias y desviación estándar (ds) de los parámetros de calidad de la carne y los recuentos microbiológicos (log UFC/cm²) en los diferentes días de almacenamiento.

	Día 0		Día 3		Día 6		Día 9		Sign.
	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	
Parámetros calidad									
N	18		18		18		18		
pH	5,56ab	0,06	5,52a	0,06	5,58b	0,08	5,57b	0,07	*
L*	48,76a	2,15	50,87ab	3,87	52,38b	4,27	53,21b	3,94	**
a*	1,72ab	1,60	2,36b	1,17	2,34b	1,01	1,06a	0,78	**
b*	8,41	0,93	8,94	1,18	9,18	1,40	8,74	1,11	ns
TBARS	0,072a	0,008	0,156a	0,058	0,270b	0,124	0,471c	0,241	***
P. exudación (%)	-		6,42	2,25	7,17	2,02	7,07	2,00	ns
Rctos. microbiológicos									
N	8		8		8		8		
A. Mesófilos	nd a	-	nd a	-	1,66b	0,24	2,54c	0,80	***
A. Psicrótrofos	nd a	-	0,98a	1,17	2,93b	0,53	4,41c	0,58	***
Enterobacterias	nd a	-	nd a	-	1,87b	0,29	1,98b	0,23	***

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre las medias; ns = $P \geq 0,1$; * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$. Nd: No detectado.

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de la grasa intramuscular (% de ácidos grasos totales) en los diferentes días de almacenamiento.

N	Día 0		Día 3		Día 6		Día 9		Sign.
	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	\bar{x}	ds	
% GIM	2,35	0,78	2,65	1,03	2,73	1,36	2,53	0,82	ns
C16:0	22,88	0,94	23,06	1,05	23,28	0,83	23,44	0,75	ns
C16:1	2,40	0,33	2,41	0,31	2,46	0,32	2,44	0,31	ns
C18:0	11,78	1,47	12,08	1,64	12,27	1,51	12,40	1,43	ns
C18:1 n-9	35,98	2,81	36,74	2,37	36,86	2,26	37,06	1,92	ns
C18:2 n-6	15,16	2,69	14,22	2,43	14,03	2,24	13,76	1,74	ns
C18:3 n-3	0,38	0,04	0,38	0,04	0,38	0,04	0,37	0,04	ns
C20:4 n-6	2,51b	1,02	2,05a	0,73	1,99a	0,69	1,84a	0,52	*
C20:5 n-3	0,07	0,03	0,06	0,02	0,06	0,06	0,05	0,02	ns
C22:5 n-3	0,32b	0,14	0,28ab	0,10	0,26a	0,07	0,23a	0,05	*
C22:6 n-3	0,06b	0,03	0,05ab	0,02	0,05ab	0,02	0,04a	0,01	*
∑AGS	36,69	2,44	37,22	2,71	37,64	2,29	37,98	2,10	ns
∑AGMI	43,12	3,22	43,85	2,80	44,08	2,70	44,26	2,41	ns
∑AGPI	20,20	4,21	18,59	3,57	18,28	3,26	17,73	2,48	ns
∑n-6	18,63	3,81	17,18	3,27	16,90	2,98	16,43	2,29	ns
∑n-3	1,04b	0,25	0,96ab	0,19	0,93ab	0,17	0,88a	0,11	*
AGPI/AGS	0,56b	0,14	0,51ab	0,12	0,49ab	0,10	0,47a	0,08	t
n-6/n-3	18,16	1,93	18,01	0,95	18,30	0,90	18,75	0,53	ns

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre las medias; ns = $P \geq 0,1$; t = $P < 0,1$; * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$.

Por otro lado, la oxidación lipídica aumentó significativamente a partir del sexto día de conservación. Martínez *et al.* (2006) concluyeron que el aumento de la concentración de O₂ en las atmósferas de envasado causaba un incremento en la oxidación lipídica, lo cual coincide con nuestros resultados. Sin embargo, en las pérdidas por exudación no se

encontraron diferencias entre los días debido a una posible destrucción previa de la estructura muscular por el efecto de la congelación sobre las proteínas miofibrilares y por ello se pierde toda el agua posible desde el primer día.

No se encontraron recuentos de aerobios mesófilos y enterobacterias hasta el día 6 de almacenamiento, alcanzando en ambos casos las 2 log UFC/cm² a día 9. Sin embargo, los recuentos de aerobios psicrótrofos se incrementaron hasta 4 log UFC/cm² a día 9. La ausencia de recuentos en los primeros días del envasado puede deberse a que la congelación previa que han sufrido las muestras produjo daño en los microorganismos retardando su crecimiento.

En la tabla 2 se muestran los resultados que se obtuvieron en el porcentaje de grasa intramuscular (GIM) y el perfil de ácidos grasos tras el almacenamiento en AP durante 9 días. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en C20:4n-6, C22:5n-3, C22:6n-3, mientras que no se produjeron diferencias entre los días de almacenamiento en el porcentaje de GIM, y en los principales ácidos grasos saturados y monoinsaturados, así como en los sumatorios totales. Se observó un descenso en los porcentajes de los principales ácidos grasos de cadena larga: C20:4n-6, C22:5n-3, C22:6n-3 a lo largo del almacenamiento en refrigeración, así como en el sumatorio de n-3 y en el índice AGPI/AGS. Estos ácidos grasos de cadena larga de la familia n-3 son los primeros en desaparecer al mantener la carne envasada en AP. Esto puede ser debido a que los ácidos grasos n-3 son más fácilmente oxidables, teniendo en cuenta que los ácidos grasos insaturados son más reactivos, sobretodo cuantos más dobles enlaces poseen (James y James, 2010).

En conclusión, la carne congelada durante un año y envasada en AP durante 9 días presentó cambios importantes en los parámetros de calidad, aumentando los valores de luminosidad (L^*) y oxidación lipídica, descendiendo el índice de rojo (a^*) en el último día, mientras que las pérdidas por exudación fueron elevadas durante todo el almacenamiento. Los recuentos microbiológicos comenzaron a ser elevados en los últimos días de almacenamiento. Además, los porcentajes de los principales ácidos grasos de cadena larga n-3, el sumatorio total de éstos y el índice AGPI/AGS sufrieron un descenso progresivo a lo largo del almacenamiento, debido a la posible oxidación de éstos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bligh y Dyer, 1959. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Estévez et al., 2011. J. Agric. Food Chem. 59: 5435-5443.
- Hansen et al., 2004. Meat Sci. 68: 479-484.
- James y James, 2010. Handbook of Meat Processing: 105-124.
- Martínez et al., 2006. Food Chem. 94: 219-225.
- Pfalzgraf et al., 1995. J. Agric. Food Chem. 43: 1339-1342.
- Sherbeck et al., 1995. J. Food Sci. 60: 250-252.

OXIDATIVE AND MICROBIAL STABILITY OF CHILLED PORK PACKAGED IN MODIFIED ATMOSPHERE FOLLOWING ONE YEAR FROZEN STORAGE

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate the behavior of pork packaged during 9 days in modified atmosphere (70% O₂/30% CO₂) following one year frozen storage on colour stability, lipid oxidation, microbial counts and intramuscular fatty acid profile. This study was conducted with 18 entire male pigs from two different crosses: P×(LR×LW) and P×(LR×D). One year frozen pork, thawed and then packaged in modified atmosphere trays at 4°C throughout a 9 days display period showed significant changes in meat quality parameters, increasing lightness (L^*) and lipid oxidation values and decreasing redness (a^*) on the last day; meanwhile, exudative losses percentage had higher values throughout all display period. Microbial counts started to increase in the last days of storage. Furthermore, there were found significant differences in the percentage of some long chain fatty acids, which were decreasing throughout storage, equally the percentage of $\Sigma n-3$ and PUFA/SFA ratio decreased.

Keywords: fatty acid composition, exudative loss, lipid oxidation, colour stability.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON ALTAS PRESIONES Y/O EL MARINADO EN SALES DE CALCIO EN LA TEXTURA Y EL COLOR DE CARNE DE AÑOJO

Albertí P., Panea, B., Albertí C. y Ripoll, G.

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón.
Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. palberti@aragon.es

INTRODUCCIÓN

El tratamiento con altas presiones hidrostáticas se está aplicando para alargar la vida útil de los productos (Hugas *et al.*, 2002), especialmente en productos derivados del cerdo, pero hay poca información en carne de vacuno. Se sabe que el tratamiento con altas presiones altera las características de la carne fresca como su color, la textura y la oxidación lipídica (Clariana *et al.*, 2011; Ma y Ledward, 2013; McArdle *et al.*, 2010).

Por otra parte, la maceración de carne en disoluciones de sales de calcio aumenta la ternura de la carne al aumentar la actividad enzimática, aunque altera su color y puede dar sabores anómalos (McArdle *et al.*, 2010). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las altas presiones hidrostáticas y la maceración en sales de calcio sobre el color y la textura, de carne de vacuno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se planteó un diseño factorial 2x2x2 de tratamiento de carne con altas presiones hidrostáticas (P), soluciones de calcio (Ca) y maduración tras el tratamiento. Para ello se utilizaron ocho redondos (m. *semitendinosus*) de $3,5 \pm 0,39$ kg de peso medio, de añojos sacrificados a los 13 meses, con un peso medio canal de $361 \pm 37,0$ kg de conformación U y engrasamiento 2. A los cinco días *post mortem* se midió el pH con un pH-metro Crison con sonda de penetración (Tabla 1). De cada redondo se cortaron 8 filetes de 3 cm de espesor perpendicularmente a la dirección de las fibras. Los filetes se envasaron al vacío y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C. Al día siguiente, 4 filetes de cada animal fueron tratados con 600 MPa durante 6 minutos, con agua a 12 °C de temperatura como fluido de transmisión, en un equipo Hyperbaric 6000 del IRTA de Monells, mientras que el resto se dejaron como control.

Tabla 1. Diagrama de tiempos y tratamientos: control (C), alta presión (P), calcio (Ca) y combinado presión más calcio (PCa).

Tiempo <i>post mortem</i>	Tiempo de ensayo	Evento
Día 0	-	Sacrificio terneros
Día 5	-	Despiece canal, muestreo de 64 filetes de 3 cm, medida pH y envasado a vacío
Día 6	-	Alta presión hidrostática (32 filetes)
Día 7	Día 0	Medida del color Lote C, envasado en bandeja con film (no P/ no Ca) Lote P, envasado en bandeja con film (sí P/ no Ca) Lote Ca, macerado en disolución Cl ₂ Ca (no P/ sí Ca) Lote PCa, macerado en disolución Cl ₂ Ca (sí P/ sí Ca)
Día 13	Día 6	Medida del color y textura
Día 20	Día 13	Medida de la textura

A los 7 días *post mortem* (Día 0 del ensayo) se sacaron todos los filetes del vacío, y se midió el color de cada filete a los 90 minutos de oxigenación. Se colocaron todos los filetes en bandejas individuales, la mitad de los filetes sometidos a presión y la mitad de los no sometidos a presión se sumergieron en una disolución 0,1M de cloruro cálcico y fueron mantenidos en una cámara a 4 °C en oscuridad. Mientras que la otra mitad se dejaron cubiertos con film, también en la cámara en oscuridad. La mitad de los filetes se mantuvo hasta el día 6 de ensayo y se midió el color y la textura. El resto estuvieron hasta el día 13, y sólo se midió su textura. La valoración de la textura instrumental se realizó en un aparato Instron 4301 equipado con una célula Warner-Bratzler. Para ello, las muestras, envasadas al vacío, se cocieron en un baño de agua hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C.

Posteriormente, una vez frías se cortaron en paralelepípedos 1 x 1 cm de sección, y se midió el esfuerzo máximo y la dureza, expresados en N/cm². En el análisis estadístico de los resultados se utilizó el procedimiento mixed, y se compararon las medias por el test de Tukey, con el paquete estadístico XLSTAT 2014 (Addinsoft).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH final de los ocho redondos medido a los 5 días fue de $5,66 \pm 0,043$, que corresponde a un valor normal de animales no estresados. El tratamiento con alta presión alteró significativamente ($P < 0,0001$) todos los atributos del color (Figura 1), aumentó la claridad, el índice de amarillo, el tono y el porcentaje de metamioglobina y disminuyó el índice de rojo y el croma. La carne había perdido su color rojo característico de carne fresca y presentaba un aspecto rosado similar al de carne ligeramente cocida (Bajovic *et al.*, 2012). Por efecto de la presión las muestras aumentan varios grados de temperatura por el proceso adiabático (Ma y Ledward, 2013). Sorenson *et al.* (2011) indicaron que los consumidores aceptaban un ligero cambio de color cuando la presión no superaba los 200 MPa. La maceración de la carne en sales de calcio durante 6 días aumentó ($P < 0,0001$) la alteración del color, tanto del lote testigo como del lote sometido a presión. La claridad y el tono aumentaron y el croma disminuyó quedando muy por debajo de 18. Estos cambios del color serían percibidos como negativos por los consumidores (Sorenson *et al.*, 2011) por lo cual no debe pensarse en emplearlo para carne fresca sino para carne que vaya a ser la base de un producto cárnico elaborado o marinado.

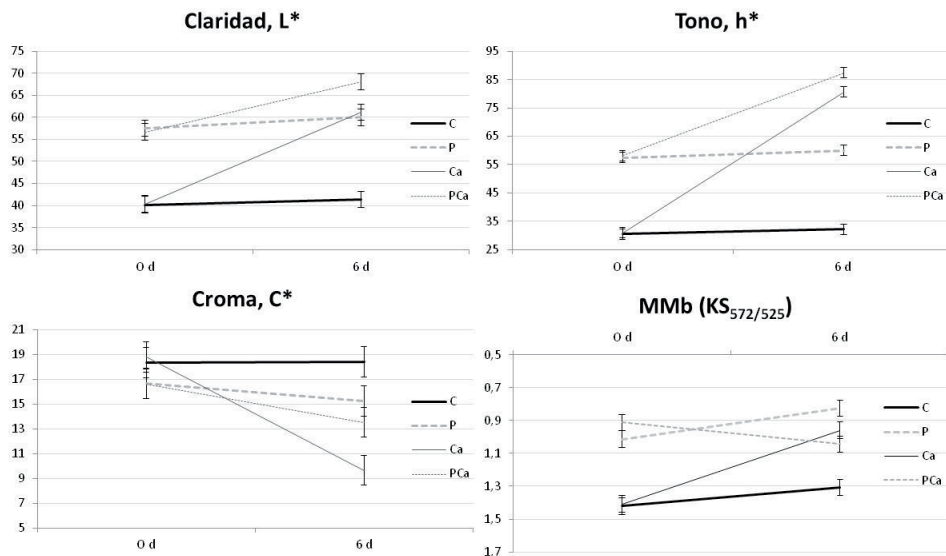


Figura 1. Claridad (L*) croma (C*), tono (h*) y metamioglobina (MMb) de filetes de redondo de los lotes: control (C) altas presiones, (P) macerado en solución de Calcio (Ca), o P y Ca, a dos tiempos (0 y 6 días).

El tratamiento con alta presión hidrostática aumentó significativamente ($P < 0,0001$) el valor del esfuerzo y la dureza (Tabla 2). El tratamiento con calcio disminuyó el valor del esfuerzo ($P < 0,03$) mientras que no modificó el valor de dureza. El tiempo extra de maduración (de 6 a 13 días) no tuvo ningún efecto en la textura de la carne. De estos resultados se desprende que la carne se compactó por efecto de la presión dando un mayor esfuerzo al corte (aumento 71%) y dureza (aumento del 33%), mientras que por efecto del calcio, la proteólisis aumentó, haciendo disminuir el esfuerzo al corte un 6%, aunque no varió la dureza.

La medida del esfuerzo al corte estaría más correlacionada con las miofibrillas, ya que aumentó por la compactación sufrida por la presión, pero disminuyó por la mayor actividad proteolítica. Mientras que la medida de dureza se correspondería con el alto contenido de colágeno del redondo (>5 mg/g) (Chriki *et al.*, 2013; Torrescoano *et al.*, 2003) que por su estructura elástica no sufre tanta compactación debida a la presión, pero tampoco aumenta su degradación por efecto del calcio. El aumento de la dureza de esta carne, debida a la alta presión aplicada, se debe a la compactación y reordenación de la estructura tras el desdoblamiento y desnaturalización de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas (Clariana *et al.*, 2011) y acortamiento del sarcómero (Jung *et al.*, 2000). Si el tratamiento con presión hubiese ido acompañado de alta temperatura (60 a 70 °C) se hubiese producido una disminución de la dureza debido a la parcial desnaturalización del colágeno (Ma y Ledward, 2004). La actividad del calcio se ve condicionada por las altas presiones ya que estas disminuyen o inactivan la actividad de la calpaína pero aumentan la actividad de la proteasa al liberar la catepsina por la rotura de los lisosomas (Ma y Ledward, 2013). El aumento de siete días de maduración no tuvo efecto en la textura de la carne debido a que la mayor disminución de la dureza se produce en muchas piezas en los primeros siete días y por lo tanto ya había ocurrido.

Por ello, estos tratamientos, solos o combinados, no tienen interés ya que el consumidor rechazaría el producto por la alteración del color o por su mayor dureza. Además, debería comercializarse como derivado cárnico y no como carne fresca, según la reglamentación de la UE.

Tabla 2. Valores de textura de los redondos sometidos a alta presión hidrostática y/o solución de calcio y mantenidos después durante 6 o 13 días.

	Alta presión			Cloruro de calcio			Maduración		
	Sí	No	E.E.	Sí	No	E.E.	6d	13d	E.E.
Esfuerzo, (N/cm ²)	73,2 ^a	42,7 ^b	2,14	56,1 ^b	59,8 ^a	1,73	57,9	58,0	2,49
Dureza, (N/cm ²)	21,2 ^a	16,0 ^b	1,11	19,3	18,0	1,34	18,2	19,1	1,04

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bajovic *et al.*, 2012. Meat Sci. 92, 280-289. Clariana *et al.*, 2011. Innov. Food Sci. Emerg. Tech. 12, 456-465. Chriki *et al.*, 2013. Livest Prod. Sci. 155, 424-434. Hugas *et al.*, Meat Sci. 62, 359-371. Jung et Lamballerie-Anton, 2000. Meat Sci. 56, 239-246. Ma *et al.*, 2004. Meat Sci. 68, 347-355. Ma *et al.*, 2013. Meat Sci. 95, 897-903. McArdle *et al.*, 2010. Meat Sci. 86, 629-634. Sorenson *et al.*, 2011. Meat Sci. 87, 81-87. Torrescoano *et al.*, 2003. Meat Sci. 64, 85-91.

Agradecimientos: Proyecto DRU-2014-02-50-00-IFO-00740020008, cofinanciado por FEADER y el Gobierno de Aragón y al eje 1 del Programa de Desarrollo Rural.

EFFECT OF TREATMENT WITH HIGH PRESSURE AND / OR MARINATING IN SALTS OF CALCIUM OF BEEF ON THE TEXTURE AND COLOR

ABSTRACT: The aim of this study was assess the effect of treatment of beef with high pressure and calcium salts solution on its texture and color. Beef muscle *semitemdinosus* aged 6 days were treated with 600 MPa of hydrostatic pressure (P), and/or marinating in solutions of calcium chloride 0.1M. Texture was measured at 7 or 14 days after treatments. Color was measured before treatments and at 6 days after treatments. Treatment with high pressure increases hardness and alters its color, changing its characteristic fresh red meat color to cooked appearance. Treatment with calcium solution spoils the beef color, becoming pale, while meat toughness slightly decreases. Therefore, these treatments, alone or in combination, have no commercial interest, since the consumer will reject owing the detrimental effects on its quality traits.

Keywords: beef, high hydrostatic pressure, calcium salts.



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

CIHEAM/IAMZ - Cursos 2014-15-16

CIHEAM

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
PRODUCCIÓN VEGETAL	* MEJORA GENÉTICA VEGETAL	29 Sep. 14/5 Jun. 15	Zaragoza	IAMZ/UdL
	* OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA	21 Sep. 15/27 Mayo 16	Córdoba	UCO/JA/CSIC/ INIA/ IAMZ
	PRODUCCIÓN INTEGRADA DE OLIVAR	9-14 Nov. 15	Zaragoza	IAMZ/COI
	ESTRATEGIAS DE GENOMA COMPLETO EN SELECCIÓN DE PLANTAS	18-22 Ene. 16	Zaragoza	IAMZ
	USO DE SENSORES EN AGRICULTURA DE PRECISIÓN	7-11 Mar. 16	Zaragoza	IAMZ
	TENDENCIAS ACTUALES EN AGRICULTURA DE CONSERVACIÓN EN CONDICIONES MEDITERRÁNEAS	4-8 Abr. 16	Zaragoza	IAMZ/FERT/ICARDA
PRODUCCIÓN ANIMAL	* MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	29 Sep. 14/26 Jun. 15	Valencia/ Barcelona	UPV/UAB/IAMZ/ IVIA/INIA
	RECURSOS FORRAJEROS EN ZONAS ÁRIDAS: FACTORES DETERMINANTES Y ESCENARIOS FUTUROS	27 Oct.-1 Nov. 14	Zaragoza	IAMZ/ICARDA
	VACUNAS EN PRODUCCIÓN GANADERA: CONCEPTOS, DESARROLLOS, REGLAMENTACIONES Y APLICACIONES	19-23 Ene. 15	Zaragoza	IAMZ/OIE
	APLICACIONES DE LA BIOINFORMÁTICA EN MEJORA ANIMAL	9-13 Mar. 15	León	IAMZ/ULE
	GANADERÍA DE PRECISIÓN	13-17 Abr. 15	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto PLF
	* NUTRICIÓN ANIMAL	28 Sep. 15/3 Jun. 16	Zaragoza	IAMZ/UZ/FEDNA/ UPM

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

- MEJORA GENÉTICA VEGETAL: 14-15; 16-17; 18-19
- OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA: 15-16; 17-18; 19-20
- NUTRICIÓN ANIMAL: 15-16; 17-18; 19-20
- MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN: 14-15; 16-17; 18-19
- PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE: 14-15; 16-17; 18-19
- MARKETING AGROALIMENTARIO: 15-16; 17-18; 19-20
- ACUICULTURA: 14-15; 16-17; 18-19
- GESTIÓN PESQUERA SOSTENIBLE: 15-16; 17-18; 19-20

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 2015. El plazo de inscripción para los cursos de Nutrición animal, Marketing agroalimentario y Gestión pesquera sostenible finaliza el 4 de mayo de 2015. 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 2016.

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, Líbano, Malta, Marruecos, Portugal, Túnez y Turquía) podrán solicitar becas que cubran los derechos de inscripción, así como becas que cubran los gastos de viaje y de estancia durante el curso. Los candidatos de otros países interesados en disponer de financiación deberán solicitarla directamente a otras instituciones nacionales o internacionales.

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

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
MEDIO AMBIENTE	* PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	29 Sep. 14/5 Jun. 15	Zaragoza	IAMZ/UdL
	CARTOGRAFÍA DE SERVICIOS DE LOS ECOSISTEMAS PARA LA PLANIFICACIÓN DEL TERRITORIO	15-19 Feb. 16	Zaragoza	IAMZ
	INDICADORES AGROAMBIENTALES Y DE DESARROLLO COMO HERRAMIENTA DE APOYO A LA GESTIÓN SOSTENIBLE DEL MEDIO RURAL	16-20 Mayo 16	Zaragoza	IAMZ
	ÁREAS PROTEGIDAS Y PLANIFICACIÓN SOCIOECOLÓGICA DEL TERRITORIO	13-17 Jun.16	Zaragoza	IAMZ
CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MARKETING DE ALIMENTOS	METODOLOGÍAS PARA LA EVALUACIÓN Y GESTIÓN DE LA VOLATILIDAD EN LOS PRECIOS DE LOS ALIMENTOS	17-21 Nov. 14	Zaragoza	IAMZ/FAO/ UE-Proyecto ULYSSES
	MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	9-13 Feb. 15	Zaragoza	IAMZ
	TECNOLOGÍAS INNOVADORAS PARA MEJORAR LA TRAZABILIDAD DE LA CADENA ALIMENTARIA	23-27 Mar. 15	Zaragoza	IAMZ
	E-BUSINESS Y E-MARKETING A LO LARGO DE LA CADENA AGROALIMENTARIA: DESARROLLOS RECIENTES	8-12 Jun. 15	Zaragoza	IAMZ
	** MÁSTER ERASMUS MUNDUS EN GESTIÓN SOSTENIBLE DE LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS (EDAMUS)	Sep. 15-Jun. 16 / Sep. 16-Jun. 17	Montpellier y otros países del Consorcio	UM1/IAMM/IAMZ/ UNIBAS/UCP/UC1
	* MARKETING AGROALIMENTARIO	28 Sep. 15/3 Jun. 16	Zaragoza	IAMZ
	MÉTODOS MOLECULARES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LOS ALIMENTOS	11-15 Abr. 16	Derio	IAMZ/AZTI-Tecnalia
PESCA Y ACUICULTURA	* ACUICULTURA	1 Oct. 14/12 Jun. 15	Las Palmas de Gran Canaria	ULPGC/IAMZ
	SUBPRODUCTOS DE LA PESCA: INNOVACIONES TECNOLÓGICAS Y USOS	22-26 Sep. 14	Zaragoza	IAMZ/FAO
	APLICACIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA EN LA SANIDAD DE ANIMALES ACUÁTICOS	15-19 Dic. 14	Zaragoza	IAMZ
	DATOS DE MARKETING DE PRODUCTOS DEL MAR: INTERPRETACIÓN DE ESTADÍSTICAS Y PREDICCIÓN DE TENDENCIAS DE MERCADO	23-27 Feb. 15	Zaragoza	IAMZ/FAO
	AVANCES EN EL CULTIVO DE PECES PLANOS	11-15 Mayo 15	Zaragoza	IAMZ
	* GESTIÓN PESQUERA SOSTENIBLE	15 Oct. 15/15 Jun. 16	Alicante	UA/MAGRAMA/ IAMZ
	GESTIÓN DE LA SEGURIDAD EN MOLUSCOS BIVALVOS	21-25 Sep. 15	Santiago de Compostela	IAMZ/FAO/USC
	SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN Y SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA	14-18 Dic. 15	Zaragoza	IAMZ
	HERRAMIENTAS PARA EL SEGUIMIENTO Y VIGILANCIA EN LOS SISTEMAS DE CONTROL DE LA PESCA	25-29 Abr. 16	Zaragoza	IAMZ
	CULTIVO DE ALGAS MARINAS: TÉCNICAS, USOS Y PERSPECTIVAS DE DESARROLLO	23-27 Mayo 16	Las Palmas de Gran Canaria	IAMZ/ULPGC

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: de la página web: de la página web: de la página web: 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

