

Sumario

Producción Animal

- Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial
New technologies applied to processing and evaluation of bovine semen in artificial insemination centers
R. Muiño, M. Fernández, H. Areán, J.L. Viana, M. López, A. Fernández, A.I. Peña 175
- Comparación entre la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente
Comparison of the activity of the colonies of Apis mellifera L. submitted to instrumental insemination with that of the colonies naturally fertilized
S.M.A. Pires, A. Josa, A.R. Costa 192
- Estrategias de apareamiento para optimizar el progreso genético y la consanguinidad del peso al sacrificio en el ganado ovino
Mating strategy to optimize genetic progress and inbreeding for slaughtering weight in sheep
M.A. Jiménez, M. Izquierdo 201
- ### Producción Vegetal
- Metodología operativa para la obtención del coeficiente de cultivo desde imágenes de satélite
Operative Methodology to Obtain the Crop Coefficient from Satellite Images
A. Cuesta, A. Montoro, A.M. Jochum, P. López, A. Calera 212
- Evolución de algunos parámetros morfológicos de la acelga recolectada hoja a hoja
The evolution of morphological parameters of swiss chard harvested leaf by leaf
P. Hoyos, V. Álvarez, A. Rodríguez 225

Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial

R. Muiño*, M. Fernández*, H. Areán*, J.L. Viana*, M. López*,
A. Fernández*, A.I. Peña**

*Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia. Xenética Fontao, S.A., Fontao-Esperante, Apdo 128. 27080 Lugo. E-mail: xeneticafontao.agri@xunta.es

**Departamento de Patología Animal. Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.

Resumen

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario. La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de criopreservación. Los nuevos sistemas computerizados para el análisis de la motilidad y de la morfometría espermática, junto con las tecnologías de fluorescencia, permiten adquirir, de forma rápida y objetiva, datos precisos sobre múltiples parámetros relativos a características estructurales y funcionales de los espermatozoides. Además, el uso de tests basados en la fecundación *in vitro* (FIV) permite obtener una valiosa información sobre la capacidad de los espermatozoides para reconocer e interactuar con los ovocitos.

En el presente artículo se revisan, aunque no de forma exhaustiva, algunas de las metodologías aplicables *in vitro* para valorar la capacidad fecundante del semen bovino, atendiendo al estudio de algunos atributos espermáticos que son útiles para valorar su capacidad funcional.

Palabras clave: Bovino, Semen, Motilidad, Morfología, Funcionalidad espermática

Summary

New technologies applied to processing and evaluation of bovine semen in artificial insemination centers

The potential fertility of a semen sample will probably depend on that a sufficient number of viable, morphologically normal and functionally competent spermatozoa reach the oviducts and establish an oviductal reservoir, accomplish normal fertilization, and contribute to sustain embryo development. *In vitro* sperm evaluation, to have any predictive value of its fertility potential *in vivo*, should include the assessment of as many morphological and functional sperm characteristics as possible, especially for the evaluation of frozen-thawed spermatozoa and of new methods for semen cryopreservation. The new computerized systems for sperm motility and morphometry analysis, and fluorescence technologies, enable multiple and objective measurements of structural and functional sperm parameters to be acquired in a short time. In addition, assays based on *in vitro* fertilization provide valuable information about the functional ability of spermatozoa when interacting with the oocytes.

In the present work some of the *in vitro* methods currently used for bovine sperm evaluation are reviewed, though not exhaustively, covering some attributes of the sperm cell that are useful in estimating its functional ability.

Key words: Bovine, Semen, Motility, Morphology, Sperm functionality

Introducción

Durante las últimas décadas, la inseminación artificial (IA) ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras ser diluido y congelado.

Uno de los objetivos prioritarios de la industria de la IA ha sido la predicción de la capacidad fecundante del semen comercializado; de esta forma se han ido sucediendo a lo largo del tiempo diferentes métodos diagnósticos, desde la evaluación de la motilidad, volumen, concentración y morfología espermática de los eyaculados hasta la contrastación de dosis de semen bovino congelado mediante sistemas de análisis computerizado, citometría de flujo y tests de funcionalidad espermática basados en la fecundación *in vitro*.

Entre los inconvenientes de las técnicas clásicas utilizadas para evaluar la calidad seminal se pueden citar por un lado, la subjetividad de las mismas, puesto que los resultados dependen en gran parte de la experiencia y habilidad del técnico, y además, el número de células analizadas en cada muestra suele ser pequeño y por tanto no representativo de la población espermática. Por otra parte, la mayoría de las tinciones para microscopía óptica empleadas tradicionalmente para la evaluación espermática, requieren el uso fijadores, como formaldehído o glutaraldehído, que suelen interferir con los diluyentes utilizados para la congelación, dificultando enormemente el análisis. Por tanto, estas técnicas no son adecuadas para la evaluación de semen congelado.

Aunque no existe ningún método que por sí mismo sea capaz predecir la capacidad

fecundante del semen (Rodríguez-Martínez et al., 1997), las modernas técnicas automatizadas son fiables, de fácil ejecución y elevada repetibilidad, por lo que permiten estandarizar y objetivar la contrastación espermática.

Evaluación del eyaculado bovino

Motilidad

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte espermático sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para el procesado posterior (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37 °C. En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la motilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas. Tras la dilu-

ción del eyaculado, o la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivo o no progresivo). Las dosis descongeladas con una motilidad progresiva inferior al 40% (NAAB, 1986) se descartan para la IA.

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000; Phillips *et al.*, 2004), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford *et al.*, 1976). La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen (Liu y Foote, 1998), es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse, de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, aunque significativa, sea baja (Kjaestad *et al.*, 1993).

Volumen y concentración

El cálculo del volumen y de la concentración de espermatozoides del eyaculado debe hacerse de forma precisa, ya que de estos dos parámetros va a depender el número de dosis seminales que pueden elaborarse a partir de un eyaculado. El volumen debe calcularse mediante pesada y transformación posterior de este valor mediante el factor de densidad correspondiente (Van Camp, 1997; Howard y Pace, 1998). La comprobación del volumen directamente en un

tubo graduado, aunque de uso frecuente, suele inducir a error, bien por la presencia de burbujas de aire, que dificultan la observación o por la inexactitud de la propia escala del tubo.

El método más preciso para evaluar la concentración espermática del eyaculado es el recuento de espermatozoides en un hemocitómetro. Este método, para uso rutinario en centros de IA, donde cada día se evalúan un gran número de eyaculados y es necesario agilizar el trabajo, se hace laborioso y lleva tiempo (Boixo, 1996). En estos casos, normalmente se opta por el uso de un espectrofotómetro, que permite estimar de forma indirecta la concentración espermática basándose en la absorción o dispersión de la luz provocada por los espermatozoides en suspensión. La determinación de la concentración espermática mediante un espectrofotómetro es un método rápido y facilita resultados con un margen de error asumible (Catena y Cabodevilla, 1999). El uso del hemocitómetro ha quedado relegado a un segundo plano, empleándose fundamentalmente para obtener la curva de calibración del espectrofotómetro, o en laboratorios en los que se evalúa un reducido número de muestras de semen o bien cuando este proceso se realiza de forma ocasional (Garner, 1997).

En la producción comercial de semen bovino congelado, el número mínimo de espermatozoides por pajueta necesario para obtener la máxima capacidad fecundante se ha establecido en 15 millones, con al menos el 50% de motilidad progresiva post-descongelación (Van Lieshout, 1995). No obstante, las dosis seminales producidas por muchos centros de IA exceden este número mínimo establecido, intentando garantizar la presencia de al menos 10 millones de espermatozoides vivos y con motilidad progresiva en cada dosis seminal. Este número mínimo, para algunos sementales excepcio-

nales, probablemente pueda ser reducido hasta 5 ó 6 millones de espermatozoides vivos por dosis sin un descenso significativo en la fertilidad (Januskaukas *et al.*, 1996), pero estos individuos tendrían que ser identificados. A partir de ese mínimo establecido, por mucho que se incremente la concentración espermática de las dosis seminales no se va a reflejar en un aumento de la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 2002).

Morfología

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra impidiendo la unión con el ovocito (Rodríguez-Martínez, 1999). A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo (Howard y Pace, 1998). Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% (Barth y Oko, 1989) han de descartarse para la congelación.

Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores) (Bloom, 1977; Barth y Oko, 1989); b) de si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente) (Milovanov, 1938; Bloom, 1977); o c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria,

si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen. Por ejemplo, si una dosis seminal tiene una motilidad espermática individual entorno al 50%, y contiene un 30% de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales, la alta incidencia de esta morfoanomalía repercutirá negativamente en la fertilidad de esa muestra pese a la buena motilidad del eyaculado. Este defecto es muy común en sementales jóvenes y normalmente su incidencia va disminuyendo a medida que el toro crece y maduran sus órganos sexuales (Amann *et al.*, 2000). Otra anomalía relativamente frecuente son los espermatozoides con la cabeza de forma piriforme. Los espermatozoides con este defecto se observó que presentaban menor capacidad de unión y de penetración de la zona pelúcida, y si conseguían fecundar a algún ovocito, los cigotos resultantes tenían menor capacidad para iniciar su desarrollo y degeneraban a las pocas horas (Thundathil *et al.*, 1999).

Un grupo de anomalías de especial importancia son las que afectan al acrosoma, y entre las más frecuentes se han descrito el acrosoma nudoso y la membrana acrosomal aplanada. Los espermatozoides con acrosoma nudoso se encontraron en el eyaculado de sementales frisonos cuya espermatogénesis estaba alterada y se cree que es un defecto de origen congénito y hereditario (Barth y Oko, 1989). Los eyaculados que contienen espermatozoides con el acrosoma nudoso suelen presentar también otras anomalías espermáticas, lo que compromete aun más la fertilidad del semental (Gran y Dott, 1976). Si el porcentaje de espermatozoides con acrosoma nudoso es elevado, se podría decir que el semental es virtualmente estéril, puesto que los espermatozoides con esta alteración se comprobó que no eran capaces de atravesar las membranas que rodean al ovocito (Thundathil *et al.*,

2000; 2002). Además, se cree que es un defecto no compensable, es decir, los espermatozoides normales presentes en el mismo eyaculado también tenían menor capacidad fecundante.

Otra anomalía acrosómica es la membrana acrosomal aplanada, que se describió por primera vez en eyaculados de toros frisones. Se observó que los espermatozoides procedentes de eyaculados bovinos con alta incidencia de esta anomalía podían unirse normalmente a la zona pelúcida del ovocito, y su matriz acrosomal permanecía funcional (Thundathil et al., 2001; Meyer y Barth, 2001). No obstante, no se investigó si los embriones eran viables o por el contrario degeneraban a los pocos días.

Las anomalías que afectan al núcleo espermático, como las vacuolas nucleares, suelen tener una menor incidencia. Thundathil et al. (1998) demostraron que los espermatozoides que presentaban este defecto nuclear se unían con dificultad a la zona pelúcida pero eran capaces de penetrar el citoplasma del ovocito y fertilizarlo, y el embrión formado continuaba su desarrollo hasta la fase de blastocisto.

Otras anomalías más frecuentes en semen bovino, como las colas enrolladas o los plegamientos de la pieza intermedia, si son abundantes en el eyaculado, pueden comprometer la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal y por tanto no van poder alcanzar las proximidades del ovocito (Nothling y Arndt, 1995).

Siempre que aparezcan anomalías en un eyaculado la fertilidad del semental puede verse comprometida, pero realmente no se sabe cuál es el porcentaje máximo de morfoanomalías espermáticas que puede ser compatible con una fertilidad normal. Lo que está demostrado es que existe una correlación negativa entre el número de formas

anormales y la fertilidad del semental (Barth y Oko, 1989; Januskauskas y Žilinskas, 2002).

Contrastación de semen bovino congelado

El método más fiable para determinar la capacidad fecundante de una dosis de semen, o para determinar si un protocolo de congelación funciona bien o no, es, obviamente, la inseminación de un gran número de vacas (Amann, 1989). Sin embargo, las pruebas de fertilidad tienen muchos inconvenientes: son muy costosas, si se utilizan pocas hembras tienen una sensibilidad muy baja, y en situaciones de fertilidad reducida resulta muy difícil identificar cuál es la función espermática afectada. Además, las diferencias cuantitativas suelen estar enmascaradas porque las dosis seminales normalmente contienen mayor número de espermatozoides del que sería necesario para poder observar una respuesta lineal en la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 1993, 2002; Saacke, 1982; Saacke et al., 1994). Por otra parte, no hay muchas dudas de que el análisis objetivo, riguroso y simultáneo, de varios parámetros relativos a las características funcionales y morfológicas de los espermatozoides, permite estimar razonablemente bien el potencial fecundante de una muestra de semen (Amann, 1989). Por tanto, no es sorprendente que no se hayan escatimado esfuerzos para el desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro*, destinadas al estudio de múltiples características funcionales y morfológicas de los espermatozoides, para intentar predecir la capacidad fecundante del semen de la forma más objetiva posible.

Sistemas de Análisis Computerizado

Desde hace varias décadas numerosos investigadores (Glover, 1968; Katz y Dott, 1975; Amann y Hammerstedt, 1980; Katz y Overs-

treet, 1981; O'Connor et al., 1981) han dedicado mucho trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas computerizados para el análisis de la motilidad espermática. Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se fue haciendo más asequible. En consecuencia, comenzaron a utilizarse cada vez con más frecuencia en veterinaria, especialmente en la especie bovina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria, en centros de IA.

Un sistema CASA consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo. Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los CASA (Boyers et al., 1989; Farrell et al., 1995), como por ejemplo:

- Análisis de motilidad: Establece una clasificación entre espermatozoides estáticos y móviles, y a su vez los móviles los clasifica según su trayectoria en progresivos y no progresivos (Tuli et al., 1992; Cseh et al., 2004).



- VCL (Velocidad Curvilínea): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.
- VSL (Velocidad rectilínea): distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer punto y el último de su trayectoria por unidad de tiempo.
- VAP (Velocidad Media): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.
- LIN (Índice de Linealidad): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Curvilínea.

$$\text{LIN} : (\text{VSL} / \text{VCL}) \times 100$$

- STR (Índice de Rectitud): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Lineal.

$$\text{STR} : (\text{VSL} / \text{VAP}) \times 100$$

- WOB (Índice de Oscilación): es la relación porcentual entre la Velocidad Lineal y la Velocidad Rectilínea.

$$\text{WOB} : (\text{VAP} / \text{VCL}) \times 100$$

Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar et al., 1991). Pero además, permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Davis et al., 1995; Holt, 1996; Abaigar et al., 1999), lo cuál es una visión más real que la motilidad media de la muestra,

puesto que una muestra de semen contiene una población heterogénea de espermatozoides. Esto explicaría, al menos en parte, que no se haya observado correlación entre parámetros medios (por ejemplo VCL, VSL, LIN o ALH) y la fertilidad in vivo de una dosis seminal (Holt y Van Look, 2004).

Además de un estudio minucioso de la motilidad, los sistemas computerizados, también permiten realizar medidas de las dimensiones de la cabeza espermática. Se conocen como sistemas ASMA (Assisted Sperm Morphology Analysis), y están diseñados para realizar medidas del área, perímetro, longitud y anchura de las cabezas espermáticas presentes en una extensión de semen fijada y teñida. Es interesante disponer de los datos morfométricos de las dosis seminales, puesto que se ha comprobado que la morfometría anormal de las cabezas espermáticas influye negativamente en la fertilidad de los sementales bovinos (Gravance *et al.*, 1996).

El uso de sistemas computerizados para la contrastación rutinaria de las dosis seminales ofrece notables ventajas, pero también posee algunos inconvenientes:

- No existe una estandarización y optimización de los equipos y procedimientos empleados en los análisis (Verstegen *et al.*, 2002). Cada laboratorio trabaja con distintos equipos y los "set up" también difieren mucho de unos equipos a otros, lo cual provoca que los resultados facilitados por los distintos centros para los mismos parámetros sean muy dispares. Esto significa que cada laboratorio debe estandarizar su propio equipo y establecer su protocolo de trabajo, teniendo en cuenta que dichos resultados serán únicamente aplicables a las muestras evaluadas con ese equipo en cuestión.
- Los sistemas CASA permiten determinar la concentración espermática de la muestra a analizar. Sin embargo, Verstegen *et al.* (2002) comprobaron, utilizando muestras de

semen de distintas especies animales, que los CASA tienden a sobreestimar la concentración de espermatozoides de la muestra. Dichos autores atribuyen el error a que, debido a las colisiones espermáticas, el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución del semen, los problemas de sobreestimación de la concentración tienden a disminuir puesto que la posibilidad de colisión disminuye.

Citometría de flujo: métodos aplicados al análisis de espermatozoides bovinos

La citometría de flujo es una técnica que permite identificar, cuantificar y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión, en función de los distintos patrones de tinción adquiridos tras el marcaje con diferentes colorantes fluorescentes, que se unen a estructuras celulares específicas o se acumulan selectivamente en compartimentos intracelulares.

A lo largo de las dos últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la investigación de poblaciones espermáticas. Se han desarrollado muchos métodos de tinción y combinaciones de fluorocromos, se han comercializado muchos fluorógenos nuevos, que permiten analizar una gran variedad de funciones espermáticas, y como resultado, hoy en día, el uso de esta técnica ofrece la posibilidad de analizar múltiples características espermáticas, simultáneamente en la misma muestra de semen, de una forma rápida, precisa y objetiva. Debido al creciente número de parámetros analizables y al desarrollo de citómetros a un coste accesible, se ha extendido su uso tanto en laboratorios de investigación como en centros de IA.

Entre las características espermáticas más frecuentemente analizadas para el control de calidad del semen bovino se incluyen el estudio de la viabilidad espermática, de la integridad acrosomal y de la funcionalidad mitocondrial, así como la investigación del estado de capacitación de los espermatozoides. Además, la citometría de flujo también permite obtener muestras de espermatozoides sexados, bien para uso en IA o en fecundación *in vitro* (Garner *et al.*, 1983; Pinkel *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 1989).

Análisis de la viabilidad espermática

El estudio de la viabilidad espermática normalmente se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables (Garner, 1997).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el Ioduro de propidio (PI). Este compuesto entra en espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del PI, existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar, como por ejemplo, el Hoechst 33258 (Keeler *et al.*, 1983; Pintado *et al.*, 2000), el bromuro de etidio (Evenson *et al.*, 1982) o la hidroetidina (HED) (Ericsson *et al.*, 1989), entre otros.

Entre los fluorocromos más utilizados para identificar la población de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluoresceínas:

CFDA: diacetato de carboxifluoresceína, (Garner *et al.*, 1988; Harrison y Vickers, 1990), CMFDA: diacetato de carboximetilfluoresceína, (Garner *et al.*, 1986) o CDMFDA: diacetato de carboxidimetilfluoresceína (Ericsson *et al.*, 1990), que son compuestos no fluorescentes capaces de atravesar membranas celulares intactas. En el interior de las células, debido a la acción de esterasas intracelulares, se convierten en carboxifluoresceína, molécula que al ser excitada a una longitud de onda de 488 nm emite fluorescencia verde, quedando retenida intracelularmente por membranas celulares intactas.

Otro fluorocromo ampliamente utilizado para identificar espermatozoides vivos es el SYBR-14, que es capaz de atravesar membranas intactas y de unirse al ADN de los espermatozoides (Garner *et al.*, 1988; Garner y Johnson, 1995). Presenta algunas ventajas con respecto a los fluorocromos basados en la actividad esterasa intracelular: es una molécula más estable, no tiene que sufrir una transformación enzimática para poder actuar, y se une específicamente al ADN del espermatozoide, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material genético no se va a marcar, y por tanto quedará descartada del análisis. El SYBR-14 suele utilizarse en combinación con PI (Garner *et al.*, 1988), y de esta forma se pueden distinguir dos poblaciones espermáticas: una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al PI, y por tanto emiten fluorescencia roja; y la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al PI pero dejan entrar el SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde.

Un fluorocromo con un mecanismo de acción similar al del SYBR-14, capaz de identificar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este compuesto también entra en células vivas y se une al ADN espermático,

sin embargo, su uso está limitado por la longitud de onda de su espectro de excitación, que está en el rango UV. La mayoría de los citómetros disponen de un láser con una longitud de onda de 488 nm, y para evaluar las muestras marcadas con Hoechst 33342, es preciso disponer de un láser de menor longitud de onda.

Con respecto a la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales hay discrepancia entre los autores. Decuadro *et al.* (2002) y Christensen *et al.* (2004) hablan de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y capacidad fecundante de las dosis, siempre que se respete una concentración espermática mínima por pajuela. Sin embargo, Graham (2001) observó que la viabilidad espermática apenas se correlacionaba con la fertilidad. Los marcadores para viabilidad espermática pueden usarse en combinación con otros fluorocromos que permiten valorar otras estructuras del espermatozoide, como la integridad de la membrana acrosomal o la funcionalidad mitocondrial.

Análisis de la funcionalidad mitocondrial

El fluorocromo Rodamina 123 fue el primero que se utilizó para evaluar la funcionalidad mitocondrial en espermatozoides humanos, y posteriormente en los de otras especies domésticas (Evenson *et al.*, 1982; Anger *et al.*, 1989; Graham *et al.*, 1990). Este fluorocromo penetra en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior. Al incidir la luz del láser sobre espermatozoides teñidos con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia verde (Ericsson *et al.*, 1993). La Rodamina 123 suele utilizarse en combinación con PI, que tiñe de rojo los espermatozoides degenerados y por tanto sin actividad mitocondrial. Aunque la Roda-

mina 123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células (Graham, 2001). Evaluando dosis de semen bovino congelado, Gillan *et al.* (2005) observaron una elevada correlación entre el porcentaje de espermatozoides positivos a Rodamina 123 y el porcentaje de espermatozoides positivos a SYBR-14, lo que indica que los espermatozoides vivos en la mayor parte de los casos tienen funcionalidad mitocondrial.

Thomas *et al.* (1998) y Garner y Cheryl (1999) desarrollaron una nueva tinción mitocondrial utilizando el fluorocromo JC-1, que permite diferenciar entre espermatozoides con baja y alta actividad respiratoria. El JC-1 se acumula en el interior de las mitocondrias, si la actividad respiratoria es elevada forma agregados intramitocondriales que emiten fluorescencia naranja, y si la actividad respiratoria es baja, el JC-1 no llega a formar agregados y emite fluorescencia verde.

Análisis de la integridad acrosomal

La integridad acrosomal puede ser valorada por numerosos procedimientos (Cross y Meizel, 1989), pero cuando se utiliza citometría de flujo como método de análisis, el más común es el uso de una lectina conjugada con un fluorocromo (Graham *et al.*, 1990; Cheryl *et al.*, 1997; Maxwell *et al.*, 1997). Entre todas las lectinas disponibles comercialmente, las más frecuentemente utilizadas son la PNA (peanut agglutinin), que se une específicamente a la membrana acrosomal interna de los espermatozoides (Cross y Watson, 1994), y la PSA (pisum sativum agglutinin), que se une a la matriz acrosomal y a la membrana acrosomal externa (Cross *et al.*, 1986; Way *et al.*, 1995). El uso de lectinas conjugadas con un fluorocromo, como por ejemplo fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), permite detectar aquellos

espermatozoides que tienen la membrana acrosomal dañada, lo cual posibilita el paso de la lectina, y por tanto del fluorógeno, al interior del compartimento acrosomal (Graham et al., 1990; Nolan et al., 1992).

Cross et al. (1986) y otros (Centola et al., 1990; Mendoza et al., 1992) describieron el uso de PSA marcada con FITC para detectar acrosomas intactos en lugar de acrosomas dañados, en espermatozoides humanos, utilizando microscopía de fluorescencia. En estos estudios, los espermatozoides tenían que ser fijados y sus membranas permeabilizadas con etanol para permitir el acceso de la lectina al contenido acrosomal. Este método se adaptó con éxito al estudio de espermatozoides de diversas especies domésticas (Berger, 1990; Mattioli et al., 1996; Sukardi et al., 1997). Sin embargo, el tratamiento de los espermatozoides con etanol no es recomendable cuando se va a utilizar citometría de flujo para el análisis de las muestras, puesto que puede causar precipitación de sales presentes en el medio extracelular y aglutinación celular (Crissman y Steinkamp, 1990), y además, dificulta el análisis simultáneo de la viabilidad espermática y de la integridad acrosomal. Por tanto, este método se utiliza más frecuentemente en combinación con microscopía de fluorescencia, mientras que con citometría de flujo, lo más común es el uso de espermatozoides vivos no permeabilizados, y por tanto la lectina detectará los acrosomas dañados.

Otra posibilidad para identificar la presencia de alteraciones acrosomales es el uso de anticuerpos monoclonales, marcados con un fluorocromo, frente a moléculas específicas del contenido acrosomal (Palencia et al., 1996; Thomas et al., 1996).

Para valorar simultáneamente el estado del acrosoma y la viabilidad espermática se pueden combinar tres fluorocromos. Por

ejemplo, Nagy et al. (2003) desarrollaron una triple tinción para espermatozoides bovinos, en la que combinaban el uso de SYBR-14 y PI, para evaluar la viabilidad espermática, con la lectina PNA marcada con ficoeritrina (PE-PNA), que tiñe en naranja los acrosomas dañados. Esta triple tinción genera la aparición de cuatro poblaciones espermáticas: 1) espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (positivos a SYBR-14 y negativos a PE-PNA), 2) espermatozoides vivos con el acrosoma dañado (positivos a SYBR-14 y positivos a PE-PNA), 3) espermatozoides muertos con el acrosoma intacto (positivos a PI y negativos a PE-PNA) y 4) espermatozoides muertos con el acrosoma dañado (positivos a PI y a PE-PNA). Durante las primeras horas tras la descongelación de las muestras, los espermatozoides vivos apenas tienen el acrosoma dañado, es decir, la segunda población espermática está ausente, sin embargo, esta población puede aparecer tras varias horas de incubación a 37 °C. Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la integridad acrosomal y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Thomas et al., 1996).

Tests de funcionalidad espermática basados en la FIV

Se han diseñado numerosos tests para evaluar *in vitro* la funcionalidad de los espermatozoides, especialmente de dosis congeladas, en relación a su capacidad para interactuar con el ovocito. Estos tests evalúan las distintas fases del proceso de fecundación, como la capacidad espermática de reconocimiento y unión a la zona pelúcida (ZP), la penetración de ovocitos homólogos o heterólogos (libres de zona pelúcida), o la inducción del desarrollo embrionario. Muchos de estos tests se han adaptado a la especie bovina y su utilidad ha sido evaluada por diversos autores (Brackett et al., 1982; Davis et al., 1987; Fazeli et al., 1993;

Lonergan, 1994; Shamsuddin et al., 1996; Zhang et al., 1995; Ward et al., 2002, 2003).

- **Tests de unión a la zona pelúcida:** Este test se diseñó con el objetivo de cuantificar el número de espermatozoides capacitados que son capaces de unirse selectivamente a la zona pelúcida de ovocitos homólogos. Los resultados de este test, en la especie humana, son altamente predictivos del resultado de la FIV (Franken et al., 1989, 1993). En algunas especies domésticas se ha intentado establecer una correlación entre los resultados del test de unión a la zona y la fertilidad *in vivo* del semen. Mientras que algunos autores encontraron una correlación positiva (Fazeli et al., 1993, 1997), otros no observaron correlación alguna (Codde y Berger, 1995; Berger, 1996; Braundmeier et al., 2002).

- **Tests de hemizona:** Es una variante del test de unión a la zona, que consiste en la microsección de un ovocito para obtener dos hemizonas con una funcionalidad equivalente a la de la zona pelúcida intacta. Ello permite comparar la capacidad de unión a la zona de espermatozoides procedentes de individuos fértiles, que funcionan como control, con la de muestras espermáticas cuya fertilidad se desconoce (Franken et al., 1993). El test de hemizona es más complejo y laborioso que el test de unión a la zona, aunque éste último exige disponer de un mayor número de ovocitos (Zhang et al., 1995).

- **Tests de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida:** Este test, desarrollado por Yanagimachi y Rogers (1976), permite valorar la capacidad de los espermatozoides para penetrar un ovocito de hámster libre de zona pelúcida. Se utiliza fundamentalmente en la especie humana para valorar la fertilidad espermática (Rogers, 1985), debido a las restricciones legales o éticas que existen en algunos paí-

ses para el uso de ovocitos humanos. Este test se ha desarrollado con éxito en la especie bovina (Brackett et al., 1982) pero su aplicación es muy escasa, puesto que es más sencillo obtener ovocitos bovinos a partir de ovarios de matadero que obtener ovocitos de hámster para luego extraerles la zona pelúcida.

- **Tests de FIV:** La fecundación *in vitro* de ovocitos homólogos es, sin lugar a dudas, el test más completo para evaluar la funcionalidad espermática, ya que permite valorar todas las fases del proceso de fecundación, desde el estado de capacitación espermática hasta la fusión con la membrana vitelina del ovocito o el inicio del desarrollo embrionario (Lonergan, 1994; Shamsuddin et al., 1996; Ward et al., 2002). Aunque en algunos estudios se ha encontrado una elevada correlación con la fertilidad *in vivo* de los toros (Hillery et al., 1990; Marquant-Le Guienne et al., 1990; Zhang et al., 1997; Ward et al., 2003), todavía se necesita una mayor estandarización de los métodos a la hora de aplicar dicha técnica, puesto que existe considerable variabilidad entre los resultados de FIV obtenidos para un mismo toro, debido a factores de variación como por ejemplo el método de selección de los espermatozoides (percoll o swim-up) (Parrish et al., 1995), de capacitación espermática *in vitro* (Saeki et al., 1995) o el número de espermatozoides utilizado para la inseminación de los ovocitos (Kroetsch y Stubbings, 1992).

Como hemos mencionado anteriormente, pocos parámetros individuales indicadores de viabilidad espermática tienen una correlación significativa con la fertilidad de la muestra de semen, y si la tienen, dicha correlación es baja (Amann y Hammerstedt, 1993). Sin embargo, la combinación de varios parámetros espermáticos, determinados objetivamente y de forma simultánea, en un análisis de regresión múltiple permite

obtener una correlación elevada con la fertilidad de los toros evaluados (Farrell *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1986). Este análisis estadístico se ha utilizado para obtener valores predictivos de la fertilidad, como la tasa de no retorno, antes de poder conocer la fertilidad de campo de dichos reproductores. Este procedimiento indica que es posible el uso de una combinación de tests de laboratorio para determinar la calidad seminal y para predecir la fertilidad potencial de un toro, especialmente para diferenciar machos infértiles o subfértiles, de sementales con fertilidad promedio elevada. Amann y Hammerstedt (2002), sin embargo, sugieren que intentar establecer correlaciones entre pruebas *in vitro* y fertilidad *in vivo* carece de validez, y que los resultados obtenidos a partir de la evaluación *in vitro* del semen deberían utilizarse para predecir machos o muestras subfértiles, mientras que los datos de fertilidad deberían utilizarse para comprobar el grado de corrección de esas predicciones.

Bibliografía

- Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Del Barrio G, 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.*, 60, 32-41.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.*, 23, 647-656.
- Amann RP, 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 2 (10), 89-98.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 1993. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J. Androl.*, 14, 397-405.
- Amann RP, Seidel GE, Mortimer RG, 2000. Fertilizing potencial *in vitro* of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54 (9), 1499-515.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 2002. Detection of differences in fertility. *J. Androl.*, 23 (3), 317-325.
- Anger J, Ronot X, Dadoune JP, 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J. Androl.*, 10, 439-448.
- Anzar M, Hassan MM, Graham EF, Deyo RCM, Singh G, 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*, 2 (36), 307-317.
- Barth AD, Oko RJ, 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press.
- Berger T, 1990. Pisum sativum agglutinin used as acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology*, 33, 689-695.
- Berger T, 1996. Fertilization in ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 351-360.
- Bloom E, 1977. Sperm morphology with reference to bull infertility. *First All-India Symp. Anim. Reprod.*, pp: 61-81.
- Boixo JC, 1996. Valoración Laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. *Inform. Vet.*, pp: 33-37.
- Boyers SP, Davis R, Katz DF, 1989. Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil*, 12, 172-200.
- Brackett BG, Cofone MA, Boice ML, Bousquet D, 1982. Use of zona-free hamster ova to assess fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.*, 5, 217-227.
- Braundmeier AG, Demers JM, Shanks RD, Saacke RG, Miller DJ, 2002. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucida as an indicator of fertility. *J. Androl.*, 23, 645-651.

- Catena M, Cabodevilla J, 1999. Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*, 1 (3), 18-31.
- Centola GM, Mattox JH, Burde S, Leary JF, 1990. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single wavelength fluorescence microscopy. *Mol. Reprod., Dev.*, 27, 130-135.
- Cheryl AT, Garner DL, Dejarnette JM, Clifton EM, 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 56, 991-998.
- Christensen P, Stenvang JP, Godfrey W, 2004. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian semen. *J. Androl.*, 25 (2), 255-64.
- Codde JM, Berger T, 1995. *In vivo* fertility of rams in relation to sperm zona pellucida binding and sperm zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology*, 44, 901-906.
- Crissman HA, Steinkamp JA, 1990. Cytochemical techniques for multivariate analysis of DNA and other cellular constituents. En: Melamed MR, Lindmo T, Mendelson ML (eds), *Flow cytometry and sorting*, 2nd ed. Wiley-Liss, New York, pp. 227-247.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW, 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacting human sperm. *Gamete Res.* 15, 213-226.
- Cross NL, Meizel S, 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.*, 41, 635-641.
- Cross NL, Watson SK, 1994. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology*, 42, 89-98.
- Cseh S, Polichronopoulos T, Solti L, 2004. Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16 (2), 128-129.
- Davis AP, Graham JK, Foote RH, 1987. Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of fluorochrome labeled acrosome reacted bull spermatozoa. *Gamete Res.*, 17, 343-354.
- Davis RO, Drobni EZ, Overstreet JW, 1995. Applications of multivariate cluster, discriminant function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.*, 63, 1051-1057.
- Decuadro H, Camus A, Guy D, 2002. Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with non return rates: a preliminary study in France. 14th Meeting European A.I VETS. pp: 105-108.
- Den Daas N, 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 87-94.
- Ericsson SA, Garner DL, Redelman D, Ahmad K, 1989. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gamete Res.*, 22, 355-368.
- Ericsson SA, Garner DL, Johnson LA, Redelman D, Ahmad K, 1990. Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using new antibiotic combinations. *Theriogenology* 33: 1211-1220.
- Ericsson SA, Garner DL, Thomas CA, Downing TW, Marshall CE, 1993. Interrrelationships among fluorometric analyser of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 39, 1009-1024.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR, 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 279-280.
- Farrell PB, Trouern-Trend V, Foote RH, Douglas Hamilton D, 1995. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil. Steril.*, 64 (1), 208-10.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH, 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm

- analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49, 871-879.
- Fazeli AR, Steenweg W, Beyers MM, Bracher V, Parlecliet J, Colenbrander B, 1993. Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. *Equine Vet. J. Suppl.*, 15, 57-59.
- Fazeli AR, Zhang BR, Steenweg W, Larsson B, Beyers MM, Van den Broek J, Rodríguez-Martínez H, Colenbrander B, 1997. Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 48, 853-863.
- Franken DR, Oehninger SC, Burkman LJ, Codrington CC, Kruger TF, Rosenwaks Z, Acosta AA, Hodgen GD, 1989. The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in *in vitro* fertilization (IVF) treatment. *J. IVF/ET* 6, 44-49.
- Franken DR, Kruger TF, Lombard CJ, Oehninger SC, Acosta AA, Hodgen GD, 1993. The ability of the hemizona assay to predict human fertilization *in vitro* in different IVF/GIFT cycles. *Hum. Reprod.*, 8, 1240-1244.
- Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, Johnson LA, 1983. Quantification of the X and Y chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 28, 312-321.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM, 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.*, 34, 127-138.
- Garner DL, Johnson LA, Allen CH, 1988. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology*, 30, 369-378.
- Garner DL, Johnson LA, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.*, vol 53, 276-284.
- Garner DL, 1997. Ancillary tests of bull semen quality. *Bull Infertility. Veterinary clinics of north america: Food Animal Practice.*, vol 13(2), 313-330.
- Garner DL, Cheryl AT, 1999. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 222-229.
- Gillian L, Evans G, Maxwell WMC, 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63(2), 445-57.
- Glover FA, 1968. Physical method of measuring the mobility of bull sperm. *Nature*, 219, 1263.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH, 1990. Analysis of Sperm Cell Viability, acrosomal Integrity, and Mitochondrial Function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43, 55-64.
- Graham JK, 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 68, 239-247.
- Gran DG, Dott HM, 1976. The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47 (2), 407-408.
- Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Casey PJ, 1996. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, 46, 1205-1215.
- Harrison RAP, Vickers SE, 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88, 343-352.
- Hillery FL, Parrish JJ, First NL, 1990. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 33, 249.
- Holt WV, 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 17-24.
- Holt WV, Van Look JW, 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction* 127, 527-535.
- Howard TH, Pace MM, 1998. Seminal evaluation and artificial insemination: Fertility and Infertility in *Veterinary Practice*. Eds: Laing JA,

- Morgan WJ, Wagner WC, Bailliere Tindall. London. U.K., 39-51.
- Januskaukas A, Söderquist L, Haard MG, Haard MCH, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez H, 1996. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of the Swedish Red and White AI bulls. *Acta vet. Scand.* 37: 461-470.
- Januskaukas A., Žilinskas H, 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika* 17 (39).
- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW, 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.*, 41, 199.
- Katz DF, Dott HM, 1975. Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 45, 263.
- Katz DF, Overstreet JW, 1981. Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil. Steril.*, 35, 188.
- Keeler KD, Mackenzie NM, Dresser DW, 1983. Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *J. Reprod. Fert.*, 68, 205-212.
- Kjaestad H, Ropstad E, Berg KA, 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.*, 34, 299-303.
- Kroestch TG, Stubbings RB, 1992. Sire and insemination dose does effect in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 37, 240.
- Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL, 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.*, 47 (2), 283-291.
- Liu Z, Foote RH, 1998. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *J. Dairy Sci.*, 81, 1868-73.
- Lonergan P, 1994. The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility. *Reprod. Dom. Anim.*, 9, 489-496.
- Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C, 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* 30, 259-266.
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E, 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 45, 373-381.
- Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA, 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 1165-1178.
- Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J, 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.*, 95, 755-763.
- Meyer RA, Barth AD, 2001. Effect of acrosomal defects on fertility of bulls used in artificial insemination and natural breeding. *Can. Vet. J.*, 42 (8), 630-4.
- Milovanov VK, 1938. The artificial insemination of farm animals. *Seljhozgiz, Moscow*.
- NAAB (National Association of Animal Breeders) Technical conference proceedings 1986. p: 102.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM, 2003. A Triple stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.*, 68, 1828-1835.
- Nolan JP, Graham JK, Hammerstedt RH, 1992. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 311-322.
- Nothling JO, Arndt EP, 1995. Fertility of two bulls with poor sperm morphology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 66 (2), 74-6.
- O'Connor MT, Amann RP, Saacke RG, 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J. Anim. Sci.*, 53 (5), 1368-1376.

- Palencia DD, Garner DL, Hudig D, Holcombe DW, Burner CA, Redelman D, Fernández GCJ, Abuelyaman AS, Kam CM, Powes JC, 1996. Determinación of activable proacrosin/acrosin in bovine sperm using an irreversible isocoumarin serine proteasa inhibitor. *Biol. Reprod.*, 55, 536-542.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL, 1995. Effects of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44, 859-869.
- Phillips NJ, Evans G, McGowan MR, 2004. Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Aust Vet J.*, 82 (5), 309-310.
- Pinkel D, Garner DL, Gledhill BL, Lake S, Stephenson D, Johnson LA, 1985. Flow cytometric determination of the proportions of X and Y chromosome bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *J. Anim. Sci.*, 60, 1303-1307.
- Pintado B, De la Fuente J, Roldan ERS, 2000. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258 or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.*, 118, 145-152.
- Rodríguez-Martínez H, Larsson B, Zhang BR, Söderquist L, 1997. *In vitro* assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod. Dev.*, 43, 1-11.
- Rodríguez-Martínez H, 1999. Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal., pp: 302-316.
- Rodríguez-Martínez H, 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. Chenoweth P.J. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York. USA.
- Rogers BJ, 1985. The sperm penetration assay: Its usefulness reevaluated. *Fertil. Steril.*, 43, 821.
- Saacke RG, White JM, 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, pp: 22.
- Saacke RG, 1982. Components of semen quality. *J. Anim. Sci.*, 55 (2), 1-13.
- Saacke RG, Nadir S, Nebel RL, 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41, 45-50.
- Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M, 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 43, 751-759.
- Shamsuddin M, Niwa K, Larsson B, Rodríguez-Martínez H, 1996. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 613-622.
- Sukardi S, Curry MR, Watson PF, 1997. Simultaneous detection of acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim. Reprod. Sci.*, 46, 89-96.
- Thomas CA, Garner DL, Cormick MC, 1996. Immunomagnetic selection of acrosome-reacted bovine spermatozoa using anti-acrosin antibodies. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 373-378.
- Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM, Marshall CE, 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 58, 786-793.
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ, 1998. Fertilization characteristics and *in vitro* embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol. Reprod. Dev.*, 50 (3), 328-33.
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ, 1999. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform shaped bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 57 (1-2), 35-50.
- Thundathil J, Meyer R, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ, 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, 54 (6), 921-34.

- Thundathil J, Palomino J, Barth A, Mapletoft R, Barros C, 2001. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented. *Anim. Reprod. Sci.*, 67 (3-4), 231-43.
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft R, 2002. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, 58 (1), 87-102.
- Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holtz W, 1992. Computer assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Theriogenology*, 487-490.
- Van Camp SD, 1997. Common causes of infertility in the bull. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 13 (2), 203-31.
- Van Lieshout JAH, 1995. Report on the AI qualivet group. Proc. 7th European AI vets Meet., The Netherlands, 1-40.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-179.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland MP, Lonergan P, 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, 57, 2105-2117.
- Ward F, Rizos D, Boland MP, Lonergan P, 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology*, 59, 1575-1584.
- Way AL, Henault MA, Killiam GJ, 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, 43 (8), 1301-1316.
- Wood PDP, Foulkes JA, Shaw RC, Melrose DR, 1986. Semen assessment fertility and the selection of Hereford bulls for use in A.I. *J. Reprod. Fertil.*, 76, 783-795.
- Yanagimachi RH, Rogers BJ, 1976. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15, 471.
- Zhang BR, Larsson B, Rodríguez Martínez H, 1995. Influence of batches of bovine oocytes on the outcome of an intact zona pelucida binding assay and *in vitro* fertilization. *Int J. Androl.*, 18, 213-220.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodríguez Martínez H, 1997. Relationship between embryo development *in vitro* and 56 day non-return rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology*, 48, 221-231.

(Aceptado para publicación el 18 de abril de 2005)

Comparación entre la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente

S.M.A. Pires*, A. Josa**, A.R. Costa*

*Escola Superior Agrária de Bragança (Departamento de Zootecnia), Apartado 1172, 5301-855 Bragança-Portugal. E-mail: spires@ipb.pt

**Facultad de Veterinaria de Zaragoza (Departamento de Patología Animal), Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza-España

Resumen

La inseminación instrumental es una técnica fundamental en el momento de plantear la selección y mejora de las abejas melíferas, no solo por la necesidad de preservar nuestros ecotipos locales, sino también por la necesidad de mejorarlos, procurando colonias con características que aumenten la producción y ofrezcan resistencia a las enfermedades (abejas resistentes a varroasis, ascosferosis, etc.).

Este estudio fue realizado con el objetivo de comparar la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente. Siguiendo la técnica de inseminación de Schley o el acoplamiento natural, comparamos los tratamientos con enfoque en el porcentaje de pérdidas, la eficacia del tipo de tratamiento, la aceptación de las reinas en las colmenas y la producción de reinas vivas y fértiles después de su introducción en las colmenas. El estudio estadístico de la información fue realizado usando el test del χ^2 .

En el laboratorio de Fisiología e Reproducción de la Escuela Superior Agrária de Bragança, realizamos la inseminación de 30 reinas y en la colmena de fecundación se dejaron acoplar naturalmente 26 reinas. Todas las reinas fueron seleccionadas según su comportamiento higiénico y productivo.

Con la inseminación instrumental, obtuvimos 80% de reinas fertilizadas y con el acoplamiento natural obtuvimos 85%. Fueron detectadas diferencias significativas ($P < 0,01$) en la aceptación de las reinas después de su introducción en las colonias de acuerdo con el tipo de fecundación. En la inseminación instrumental la aceptación en las colmenas fue de 58,4%, y en la fecundación natural fue de 72,7%. Del mismo modo, el número total de reinas vivas y fértiles varió significativamente ($P < 0,01$) según el tipo de fecundación a que fueron sometidas las reinas. Con la inseminación instrumental, obtuvimos una producción de 47,6% de reinas vivas y fértiles mientras que con la fecundación natural se observó mejores resultados (61,5%).

Palabras clave: *Apis mellifera*, Reinas, Acoplamiento natural, Inseminación instrumental

Summary

Comparison of the activity of the colonies of *Apis mellifera* L. submitted to instrumental insemination with that of the colonies naturally fertilized

Instrumental insemination is a fundamental technique in the moment when we select and improve the honeybee, not only in order to preserve our local ecotypes, but also due to the necessity to improve them, looking for hives with characteristics that increase the production and offer resistance to diseases (bees resistant to Varroa, Ascospaeriosis, etc.).

This study was carried out with the aim of comparing the activity of the colonies of *Apis mellifera* L. submitted to instrumental insemination with the activity of the colonies naturally mated. Following Schley's insemination technique or natural mating, we compared treatments with regards to the percentage of losses, the effectiveness of the kind of treatment, the acceptance of the queens in the hives and the production of fertile queens that survived their introduction in the hives. The statistical analysis of the information was done using the χ^2 Test.

In the laboratory of Physiology and Reproduction of Superior Agrarian School of Bragança, we carried out the insemination of 30 queens and in the mating hive 26 queens were allowed to mate naturally. All the queens were selected according to their hygienic behaviour and their productiveness.

With the instrumental insemination we obtained 80% of fertilized queens and, with the natural mating we obtained 85%. There were different frequencies ($P < 0.01$) in the acceptance of the queens after their introduction in the colonies according to the kind of fertilization. Through the instrumental insemination the acceptance in the hives was 58.4%, and with natural fecundation was 72.7%. Likewise, the total number of fertile and living queens varied significantly ($P < 0.01$) according to the kind of technique that was used. With the instrumental insemination, we obtained a production of 47.6% of fertile and living queens while the natural mated queens showed better results (61.5%).

Key words: *Apis mellifera*, queens, natural mating, instrumental insemination

Introducción

Según Harbo (1986) los principios básicos de la inseminación instrumental en apicultura fueron desarrollados entre los años 1926 a 1947, iniciándose la técnica moderna en los EE.UU. con el trabajo de Watson en el año de 1927 (Woyke, 1976; Laidlaw, 1989a,b; Schley y Guth, 1990; Crane, 1992; Morse, 1994). Este método se basaba en la utilización de una microaguja fijada a un micromanipulador, la reina se fijaba con un hilo de seda a un pedazo de madera y la cámara del agujón era abierta con una pinza mantenida con la mano (Woyke, 1976 y Laidlaw, 1989b). Además, Watson (1927) introdujo otras características que se mantienen en la actualidad en la práctica de la inseminación, como son, la utilización del microscopio y luz artificial, la decapitación de los zánganos para provocar la eyaculación, la utilización del esperma de varios zánganos en la inseminación e incluso desechó la denominación de "inseminación artificial" por la de "inseminación instrumental", como añade Laidlaw (1989a).

Otras particularidades fueron perfeccionadas a lo largo del tiempo y aportaron mejoras a esta técnica, como por ejemplo, la observación hecha por Mackensen (1947) donde se provoca que una reina ponga huevos tratándola dos veces con CO_2 (Woyke, 1976; Mackensen y Ruttner, 1976; Harbo, 1986; Laidlaw, 1989a,b). Las dos narcosis se pueden realizar en el tiempo de 10 minutos y se practican a intervalos de un día, pudiendo estar o no seguidas por la inseminación; pero también se puede administrar un tercer tratamiento, para estar seguros del éxito, como añadieron Mackensen y Ruttner (1976).

Una particularidad relativa a los machos es el hecho de que el esperma de los zánganos puede conservarse "in vitro" a temperaturas mayores a 0 °C, durante algún tiempo (Taber y Blum, 1960 y Taber, 1961, citados por Woyke, 1976), más precisamente, en la jeringa almacenado a una temperatura de 20 a 25 °C durante dos días (Harbo, 1986). Además, cuando se mezcla con estreptomina y se introduce en capilares de vidrio, cerrados y conservados a una temperatura

de 13-15 °C, todavía se puede lograr fecundar con él después de 35 semanas (Poole y Taber, 1970, citados por Woyke, 1976).

En lo que respecta a la técnica de introducción de reinas, la introducción de la reina en un núcleo de 3-5 cuadros, con suficientes abejas jóvenes y cría operculada, es uno de los métodos recomendados y biológicamente más adecuado para su manutención (Drescher, 1976).

Este estudio fue realizado con el objetivo de comparar la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente, en lo que concierne a su aceptación según el tipo de apareamiento.

Material y métodos

Este estudio fue realizado en la ciudad de Bragança, perteneciente a la provincial de Trás-Os-Montes y ubicada en el Nordeste de Portugal, cuyas coordenadas son latitud 41° 49' N, longitud 6° 40' W y se encuentra, aproximadamente, a 720 m de altitud.

El ensayo se llevó a cabo entre Julio de 1995 y mayo de 1997, en uno de los colmenares experimentales que el Instituto Politécnico de Bragança posee en el área de influencia del Parque Natural de Montesinho y en el laboratorio de Fisiología e Reproducción de la Escuela Superior Agrária de Bragança. Esta es una zona de gran atracción melífera, por la variedad de flora que presenta el matorral. Las cuarenta colonias testadas estaban alojadas en colmenas del modelo Lusitana, de diseño nacional. Caracteres destacados de éstas son el hecho de que solamente llevan medias alzas, con una población agrupada entre dos a cuatro alzas y un cuerpo de cámara de cría. El origen del apiário es simple, una vez que fue

formado por enjambres autóctonos ya existentes en el colmenar. A su vez, el manejo es estable, pues, no hacen trashumancia.

Material utilizado en la inseminación instrumental

Para el desarrollo de la metodología de la inseminación instrumental se utilizó un aparato de inseminación tipo estándar, según Schley, y además se emplearon los siguientes accesorios:

- una lupa binocular con una ampliación de 7 a 20 aumentos, la cual tiene un brazo flexible y giratorio;
- tubos capilares, para la conservación del esperma;
- marcadores de colores diferentes, para identificar la edad de los zánganos;
- caja de vuelo Andersen, para el transporte de los machos y recolección del esperma;
- jaulas pequeñas, para el transporte de las reinas con 5-10 acompañantes;
- botella de CO₂.

Material empleado en la introducción de reinas (enjaulado)

Para la realización de la técnica de introducción se emplearon unas jaulas de plástico, blancas, pequeñas y rectangulares similares a las jaulas de introducción de Miller, aunque diferían de estas en que solo tienen un orificio de entrada.

Preparación de las reinas para la inseminación

Las reinas destinadas para la inseminación fueron mantenidas en libertad en los "baby-núcleos" o núcleos de fecundación, desde la eclosión hasta el quinto o sexto día

de vida. Para evitar el vuelo no controlado de estas reinas se instaló, delante de la piquera, un excluidor, cuyos separadores eran de plástico.

En el día de la inseminación, las reinas fueron transportadas por la mañana desde el colmenar de fecundación hasta el laboratorio, en una jaula pequeña con 5 a 10 acompañantes y el respectivo alimentador con "candi" en pasta. La distancia aproximada fue de 20 Km.

Preparación de la cría y mantenimiento de los zánganos para la inseminación

Para la producción de los zánganos se partió de colonias seleccionadas del mismo colmenar, conocidas por su excelente capacidad limpiadora y su rendimiento como criadoras. Algunos días antes de la eclosión, los panales con cría de zánganos eran marcados con alfileres, con el objeto de controlar su eclosión. Para conocer la edad mínima de los zánganos presentes durante 2 a 3 días, a lo largo de la eclosión, los individuos recién nacidos fueron marcados con tinta de colores diferentes. Esto se realizó a primeros de junio de 1996.

Al cabo de algunos días (10 a 12 días), los zánganos eran llevados de las colmenas al laboratorio de Fisiología y Reproducción de la Escuela Superior Agrária (Instituto Politéc-

nico de Bragança), en una caja de vuelo tipo Andersen, descrita por Dustmann *et al.* (1991). La caja fue construida manualmente, de madera con una parte de red de alambre, un alimentador y una jaula para separar los zánganos de las eventuales obreras agregadas para su cuidado (en número por lo menos igual al de los machos). Los zánganos fueron capturados en la piquera cuando regresaban del campo.

Preparación de la inseminación instrumental

Se siguió la técnica de inseminación de Schley, descrita por Schley y Guth (1990) y Dustmann *et al.* (1991). Fueron utilizados en media 10 a 12 zánganos, por cada reina inseminada, los cuales tenían una edad aproximada de 10 a 12 días.

La recolección del esperma se realizó a mediados de junio, mediante recogida artificial, prensando el abdomen de cada zángano, y éste fue conservado en tubos capilares a temperatura ambiente de 21 °C (una a dos semanas), como describieron Harbo y Williams (1987), Harbo (1989) y Guth (1990). Se utilizó como diluyente la solución salina fisiológica de Hyes, de sencilla elaboración y eficacia comprobada, de acuerdo con varios autores, Ruttner y Tryasko (1976), Moritz (1989), Kuhnert (1990) y Dustmann *et al.* (1991) (tabla 1).

Tabla 1. Composición de la solución fisiológica de Hyes (Ruttner y Tryasko, 1976)
Table 1. Physiological saline solution according to Hyes (Ruttner and Tryasko, 1976)

Componentes	Cantidad (Gramos)
Cloruro de sodio (NaCl)	9,0
Cloruro de calcio (KCl)	0,2
Cloruro de potasio (CaCl)	0,2
Hidrocarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0,2
Diluyendo en 1000 ml de agua destilada	

Las inseminaciones se efectuaron a finales del mismo mes, para las cuales se respetaron los siguientes pasos: toma del esperma en la jeringa, instalación y narcosis de la reina e inseminación.

Mantenimiento de las reinas después de la inseminación

Las reinas inseminadas fueron introducidas en las jaulas para posterior transporte hasta el colmenar de fecundación, donde se dejaron libres en los respectivos "baby-núcleos". El excluidor se sacó de la piquera solo después de haber comprobado el inicio de la puesta.

Técnica de introducción de las reinas

Se siguió la técnica de las jaulas de introducción, según Miller descrito por Laidlaw (1979) y Ruttner (1987).

El día anterior a la realización del repoblamiento se dejaron huérfanas 33 colmenas del apiario. A su vez, las jóvenes reinas, ya marcadas, se transportaban del colmenar de fecundación en las jaulas de introducción tipo Miller. Éstas reinas, inseminadas instrumentalmente o fecundadas naturalmente, se introdujeron sobre un panal, en la zona de la cría a punto de nacer. El principio básico de esta técnica de introducción tiene como objetivo estimular las abejas de la colonia a consumir la solución azucarada del comparti-

miento del "candy", permitiendo de esta forma, su entrada y familiarización con la reina. Al cabo de dos a tres días, la entrada se queda libre y las obreras pueden entrar en el compartimiento donde está la reina y ésta, ya aceptada, puede salir. Pasados 8 a 10 días se puede verificar la aceptación verificando si hay puesta en los cuadros de la colmena o observando la reina marcada.

Estudio estadístico

Hemos aplicado el test del χ^2 (Snedecor y Cochran, 1980) para evaluar la frecuencia de los datos del grado de aceptación de las reinas seleccionadas (inseminadas instrumentalmente y fecundadas naturalmente).

Resultados

Tras la realización de la inseminación instrumental y mediante el acoplamiento natural, hemos expresado en la tabla 2 la comparación entre tratamientos, relativos al porcentaje de pérdidas, eficacia del tipo de tratamiento, aceptación de las reinas en las colonias y producción de reinas fértiles y vivas después de su introducción en las colonias. Mediante los dos tratamientos pudimos estudiar con mayor detalle la eficacia durante el período de apareamiento.

Tabla 2. Comparación entre los dos tipos de fecundación a que fueron sometidas las reinas seleccionadas

Table 2. Comparison of the two types of fecundation to which the selected queens were submitted

Técnica	N.º de reinas	%total de pérdidas	% de la eficacia	% de aceptación en las colonias	% total de reinas vivas y fértiles en producción
Inseminación instrumental	30	20,0	80,0	58,4	46,7
Fecundación natural	26	15,0	85,0	72,7	61,5

En la inseminación instrumental obtuvimos pérdidas del orden del 20% que fueron debidas, en parte (7%) a la muerte de las reinas en el transporte desde el colmenar de fecundación hasta el laboratorio donde hacíamos la inseminación y posteriormente, del laboratorio hasta el colmenar de fecundación. Las otras pérdidas, del orden del 13%, fueron observadas en los "núcleos baby", ya después de la inseminación. A su vez, en la fecundación natural las pérdidas fueron inferiores (15%) y presumiblemente ocurrieron en los vuelos de apareamiento.

En lo que concierne al éxito de cada técnica puede observarse que obtuvimos una eficacia del orden de los 80% con la insemina-

ción instrumental, una vez que esta es la tasa de reinas fértiles después de la aplicación de la técnica de inseminación.

También se puede observar una tasa del 85% resultante de los acoplamientos naturales, sin embargo, esta diferencia no es muy elevada si hacemos la comparación entre los dos tipos de fecundación.

Por otra parte, para contrastar los resultados entre la aceptación de las reinas inseminadas y fecundadas naturalmente, así como el porcentaje de dichas reinas vivas y fértiles después de su introducción en las colonias, realizamos una prueba de contingencia usando el estadístico χ^2 , para probar la hipótesis de independencia nula entre ambas variables (tabla 3).

Tabla 3. Valores de χ^2 y respectivo grado de significación aplicados a las frecuencias obtenidas de la aceptación de las reinas después de su introducción en las colonias, y del número de reinas vivas y fértiles entre los dos tipos de fecundación

Table 3. . Values of χ^2 and respective degree of significance applied to the frequencies obtained regarding the acceptance of the queens after their introduction in the colonies and the number of fertile and living queens in the two kinds of fecundation

I.I./N.F.	χ^2	Valores de P
% aceptación	4,978	0,01
% total de reinas	4,537	0,01

Obtuvimos un χ^2 bajo pero significativo ($P < 0,01$), por lo que rechazamos la hipótesis nula y afirmamos que existe asociación y, por tanto, hay diferentes frecuencias en la aceptación de las reinas en las colonias según el tipo de apareamiento. Con la inseminación instrumental obtuvimos un porcentaje de aceptación en las colonias de 58,4%, mientras que con la fecundación natural fue de 72,7%. Este hecho

demuestra la dificultad que hay, muchas veces, en la aceptación de reinas inseminadas instrumentalmente. Vemos también que, efectivamente hay diferencias significativas ($P < 0,01$) entre el número total de reinas vivas y fértiles (total de reinas), respecto al tipo de técnica seguida, lo que esta relacionado con el bajo o elevado grado de aceptación de dichas reinas en las colonias.

Discusión

Las inseminaciones se efectuaron casi a finales de junio y además de las temperaturas elevadas existentes, fue necesario recorrer una distancia aproximada de 20 Km. Por lo cual, pensamos que estas razones pueden explicar posibles daños que hayan ocurrido y provocado la muerte de las reinas.

Las pérdidas observadas en los "núcleos baby" (13%), ya después de la inseminación, demuestran posiblemente el papel importante que juega la experiencia del inseminador. Aunque ya habíamos comprobado la técnica de inseminación instrumental, todavía no la hacíamos con mucha frecuencia.

Del valor obtenido con la inseminación instrumental deducimos que nuestra tasa es normal, una vez que, según Ruttner (1987), una eficacia del 80% de reinas fértiles puede ser considerada como satisfactoria. Estos resultados están en concordancia con otros trabajos preliminares, como el de Ruttner (1961), quién constató en 10 reinas acopladas naturalmente una capacidad de puesta de un 106% y en sus hermanas (10) inseminadas instrumentalmente un 92%, en comparación con el promedio general. Ya posteriormente, Woyke y Ruttner (1976) añadieron que parece que las reinas acopladas naturalmente viven, por término medio más, pero que estas diferencias son insignificantes en el primer año.

El gran número de reinas introducidas y no aceptadas puede ser explicado por el hecho de que estábamos en una época en que la flora melífera ya había pasado su clímax y así, el flujo de néctar era más bajo y las abejas estaban más agresivas, consecuentemente disminuyendo el grado de aceptación de las reinas. Otros factores externos pueden ser señalados tales como el pillaje, la estación del año y las condiciones climáticas en el período de la introducción (Ruttner,

1983). Este autor afirmó que el éxito de la introducción depende no solo de esto, sino también de una multiplicidad de factores, tales como, las condiciones de la reina residente (edad, puesta y actividad), las condiciones de la reina a introducir (tipo de apareamiento, daños en el transporte, actividad de puesta, producción de feromonas), el tamaño y peso de las reinas y las condiciones de la propia colonia que vaya a recibir la joven reina (raza, agresividad, desarrollo estacional y la proporción entre las abejas jóvenes y las más viejas).

Por tanto, cabe suponer que aunque sean muchos los métodos recomendados para la introducción de las reinas en las colonias parece que no hay referencias disponibles de alguno infalible ya que la aceptación de una reina o su no aceptación por parte de la colonia sigue siendo aún difícil de entender.

Así, nuestros resultados están de acuerdo con la bibliografía revisada sobre las mismas técnicas aplicadas por los varios autores, entre ellos, Drescher (1976), Ruttner (1983), (1987), Jean-Prost (1989) y Woyke (1989).

Conclusiones

Teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrolló al presente trabajo, las metodologías utilizadas y los resultados obtenidos, pensamos que es posible sacar el siguiente conjunto de conclusiones:

- Mediante la inseminación instrumental las abejas locales presentaron una fertilidad del orden del 80%. Sin embargo debe mejorarse la metodología ya que el porcentaje total de reinas vivas y fértiles obtenidas es sensiblemente inferior a la fecundación natural (46,7% vs 61,5%).
- El porcentaje de aceptación de las reinas en las colonias varía significativamente con

el tipo de fecundación a que fueron sometidas. Con la inseminación instrumental la aceptación de las reinas en las colonias fue de 58,4%, y con las acopladas naturalmente de 72,7%.

Bibliografía

- Crane E, 1992. Bees and beekeeping: science, practice and word resources, 612 pp. Heinemann Newnes, Oxford (Reino Unido).
- Drescher W, 1976. Cría y mantenimiento de las reinas y de los zánganos, pp. 25-38. En: Inseminación Artificial de las Reinas de Abejas (2ª edición). Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Dustmann JH, Kuhnert M, Schley P, Tiesler K, 1991. Instrumental insemination of queen bees, pp. 23. Ed. Institut fur den Wissenschaftlichen Film, Gottingen (Alemania).
- Guth J, 1990. La conservation de sperme, pp. 108-109. En: Elevage, Sélection et Insémination Instrumentale des Reines D'Abeilles. J. Guth (Ed.), Ed. Syndicat National D'Apiculture, Paris (Francia).
- Harbo JR, 1986. Propagation and instrumental insemination, pp. 361-389. En: Bee Genetics and Breeding. Thomas E. Rinderer (Ed.), Ed. Academic Press Inc., Orlando (EEUU).
- Harbo JR, 1989. Sperm Storage, pp. 59-64. En: The instrumental insemination of the queen bee. R.F.A. Moritz (Ed.), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Harbo JR, Williams JL, 1987. Effect of above freezing temperature on temporary storage of honey-bee spermatozoa. J. Apic. Res. 26, 53-55.
- Jean-Prost P, 1989. Apicultura. Conocimiento de la abeja-Manejo de la colmena. Mundi Prensa (Ed.), 726 pp., Madrid (España).
- Kuhnert ME, 1990. La technique d'homogenisation du sperme d'abeille, pp. 102-111. En: Elevage, Sélection et Insémination Instrumentale des Reines D'Abeilles. J. Guth (Ed.), Ed. Syndicat National D'Apiculture, Paris (Francia).
- Laidlaw HHJR, 1979. Contemporary queen rearing. Dadant y Sons Inc. (Ed.), 199 pp., Hamilton (EEUU).
- Laidlaw HHJR, 1989a. Instrumental insemination of honey-bee queens. Pictorial instructional manual. Dadant y Sons Inc. (Ed.), 144 pp., Hamilton (EEUU).
- Laidlaw HHJR, 1989b. Origin and development of instrumental insemination of queen bees, pp 9-18. En: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. R.F.A. Moritz (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Mackensen O, 1947. Effect of carbon dioxide on initial oviposition of artificially inseminated and virgin queen bees. J. Econ. Entomol., 40, 344-349.
- Mackensen O, Ruttner F, 1976. Técnica de inseminación, pp. 69-86. En: Inseminación artificial de las reinas de abejas. Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Moritz RFA, 1989. The insemination procedure, pp. 65-84. En: The instrumental insemination of the queen bee. R.F.A. Moritz (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Morse RA, 1994. Rearing queen honey bees, 128pp. Wicwas Press (Ed.), Cheshire (EEUU).
- Poole HK, Taber S, 1970. In vitro preservation of honeybee semen enhanced by storage at 13-15°C. Ann. Ent. Soc. Amer. 63, 1673-1674.
- Ruttner F, 1961. Insemination mit sperma von einem einzgen drohn. Bee Genetics, 2, 15.
- Ruttner F, 1987. Cría de reinas, pp. 119-125. En: Lo mejor de vida apícola (1982-1986). F. Ruttner (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Ruttner F, Tryasko VV, 1976. Anatomy and physiology of reproduction, pp. 11-24. En: The instrumental insemination of the queen bee. R.F.A. Moritz (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Ruttner H, 1983. Transport and introduction, pp. 279-294. En: Queen rearing - Biological basis

- and technical instruction. F. Ruttner (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Schley P, Guth J, 1990. Insémination instrumentale, pp. 61-102. En: *Elevage, selection et insemination instrumentale des reines d'abeilles*. J. Guth (Ed.), Ed. Syndicat National D'Apiculture, Paris (Francia).
- Snedecor GW, Cochran WG, 1980. *Statistical methods*, 185 pp. Iowa State University Press, Ames (EEUU).
- Taber S, 1961. Forceps designed for transferring honey bee eggs. *J. Econ. Entomol.* 54, 247-250
- Taber S, Blum MS, 1960. Preservation of honey bee semen. *Science* 131, 1734-1735.
- Woyke J, 1976. Historia de la inseminación instrumental de la abeja melífera, pp. 7-11. En: *Inseminación artificial de las reinas de abejas*. Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Madrid (España).
- Woyke J, 1989. Correct queen maintenance before and after instrumental insemination, tested in Egypt. *J. Apic. Res.* 28(4), 187-190.
- Woyke J, Ruttner F, 1976. Resultados, pp. 87-92. En: *Inseminación artificial de las reinas de abejas*. Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Madrid (España).
- (Aceptado para publicación el 23 de mayo de 2005)

Estrategias de apareamiento para optimizar el progreso genético y la consanguinidad del peso al sacrificio en el ganado ovino

M.A. Jiménez*, M. Izquierdo**

*Departamento de Mejora Genética y Animal. INIA. Carretera de La Coruña, Km. 7. 28040 Madrid.

**Instituto de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Consejería de Infraestructura y Desarrollo Tecnológico. Junta de Extremadura. Finca La Orden. 06701 Guadajira. Badajoz.

Resumen

Datos de pesos tipificados a 70 días de edad (PT70) de animales pertenecientes al esquema de selección de la raza Ile de France, han sido utilizados para realizar un estudio de simulación. Se han comparado diversas estrategias de apareamiento de los machos utilizados en las pruebas de descendencia, con el objeto de optimizar el esquema de selección de dicha raza. Para un número de hembras constante, las estrategias simuladas (5 machos en prueba de descendencia con 60 hembras cada uno, 10 machos con 30 hembras, y 20 machos con 15 hembras cada uno) se han comparado en función de la ganancia genética y la consanguinidad alcanzada al final del proceso selectivo. El progreso genético alcanzado al final de las 18 generaciones simuladas ha sido ligeramente superior cuando se ha considerado un mayor número de hembras por macho (5 machos con 60 hembras cada uno). Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en ganancia genética entre las tres estrategias testadas. Teniendo en cuenta que el criterio que considera 5 machos en prueba ha obtenido valores de consanguinidad significativamente más elevados (8%) frente a las otras estrategias (6%), se establecen como opciones más adecuadas para la optimización del esquema de selección, las alternativas que incluyen un mayor número de machos con un menor número de hembras en prueba de descendencia.

Palabras clave: Ile de France, pruebas de testaje, ganancia genética, simulación

Summary

Mating strategy to optimize genetic progress and inbreeding for slaughtering weight in sheep

Lamb data of 70-day live weights from the breeding program of the Ile de France breed have been used to perform a Monte-Carlo simulation study. Different mating strategies of the number of females per male used in progeny test have been compared, to optimise the genetic progress of the breed for this trait. For a constant female number, the simulated strategies have been: 5 males mated with 60 females each, 10 males mated with 30 females each, and 20 males with 15 females each. Genetic gain and inbreeding coefficient at the end of the process have been compared for each strategy. Genetic gain at the end of 18 generation simulated have been larger for the strategy of 5 males with 60 females than for the other strategies. However, not significant differences for genetic gain have been found among the three strategies. Considering that 5 males with 60 females has been the strategy with a larger inbreeding gain (8%), in relation to the other strategies (6%), the options that used a large amount of males are more convenient than the strategy with only 5 males.

Key words: Ile de France, progeny tests, Genetic gain, Monte-Carlo simulation

Introducción

La selección de una raza basada en los métodos actuales de evaluación (BLUP), supone un aumento de la precisión y de la magnitud de la respuesta de la selección. Sin embargo, el uso de estas metodologías, que utilizan toda la información familiar, conduce a un incremento de los niveles de consanguinidad (Wray y Thompson, 1990; Villanueva *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1998), dada la tendencia a escoger un mayor número de animales de un menor número de familias (Quinton *et al.*, 1992). La relación entre el aumento progresivo de los niveles de consanguinidad y el descenso de los valores fenotípicos ha sido analizado y caracterizado en diversos estudios (Lamberson y Thomas, 1984; Wiener *et al.*, 1992; Burrow, 1993; Van Wyk *et al.*, 1993; Analla *et al.*, 1998; Pariacote *et al.*, 1998), y ha permitido reorganizar las tácticas de estructuración de las poblaciones (López y Silió, 1992) con el objetivo final de evitar fuertes impactos de la depresión por consanguinidad.

Formando parte de la dinámica de un esquema de selección, el uso de machos de IA (en prueba de testaje y mejorantes) permite la disminución de los niveles de consanguinidad de la población al evitar el apareamiento entre parientes. Estos machos de referencia son valorados, principalmente, por la información genética de sus descendientes, encontrando mayor precisión en la estimación de los valores genéticos (Hudson *et al.*, 1980; Lewis y Simm, 2000), y en la difusión y progreso genético alcanzado (Nimbkar y Wray, 1991; Lewis y Simm, 2000) cuando mayor es el número de hembras con las que se cruza un macho. Establecer la cantidad de información necesaria para valorar un semental y maximizar el progreso genético, es por tanto, una cuestión a considerar en la mejora del proceso selecti-

vo (Analla y Serradilla, 1996; Analla *et al.*, 1997), junto con el desarrollo de apropiadas políticas de apareamiento que eviten el excesivo aumento de los niveles de consanguinidad de la población (Villanueva *et al.*, 1995; Caballero *et al.*, 1996; Lewis y Simm, 2000).

En esta línea, existen desarrollos más recientes que maximizan el progreso genético restringiendo los niveles de consanguinidad. Estos métodos están basados en la optimización de las contribuciones (Meuwissen, 1997), algoritmos que mantienen constantes las tasas de consanguinidad actuando sobre el número de individuos a seleccionar en cada generación y el número de descendientes de los mismos (Meuwissen y Soneson, 1998; Grundy *et al.*, 2000; Soneson y Meuwissen, 2000).

La raza ovina Ile de France es una raza de aptitud cárnica utilizada en el cruzamiento industrial con razas autóctonas españolas, especialmente con ovejas Merinas (Sánchez Belda, 1986; Sierra, 1989). Su descendencia se caracteriza por tener buenos índices de crecimiento, y canales bien conformadas y poco engrasadas (Espejo *et al.*, 1996). La raza Ile de France, dentro de la agrupación de Ovinos Precoces, cuenta con el mayor censo de hembras reproductoras (mayores de un año) inscritas en el Libro Genealógico (13.511 individuos), así como el mayor número de ganaderías (35) y animales valorados genéticamente (11.200) (Espinosa de los Monteros y Jiménez, 2001), habiéndose incrementado su censo en unos 6.000 animales en los últimos años.

Dada la importancia de la raza, se pretende optimizar la estrategia de apareamiento de los machos sometidos a las pruebas de testaje, buscando un mayor progreso genético sin comprometer los rendimientos productivos de los animales por el aumento de la consanguinidad.

Material y métodos

Para el desarrollo de este estudio se ha simulado una población formada por 3.014 hembras y 154 machos de monta natural distribuidos en 24 ganaderías. Se han simulado un total de 18 generaciones, y se han

realizado 15 réplicas, utilizando una semilla distinta en el inicio de cada réplica.

El esquema de selección desarrollado ha tomado, como pautas, el Programa de Mejora y Selección puesto en marcha en la raza Ile de France (figura 1).

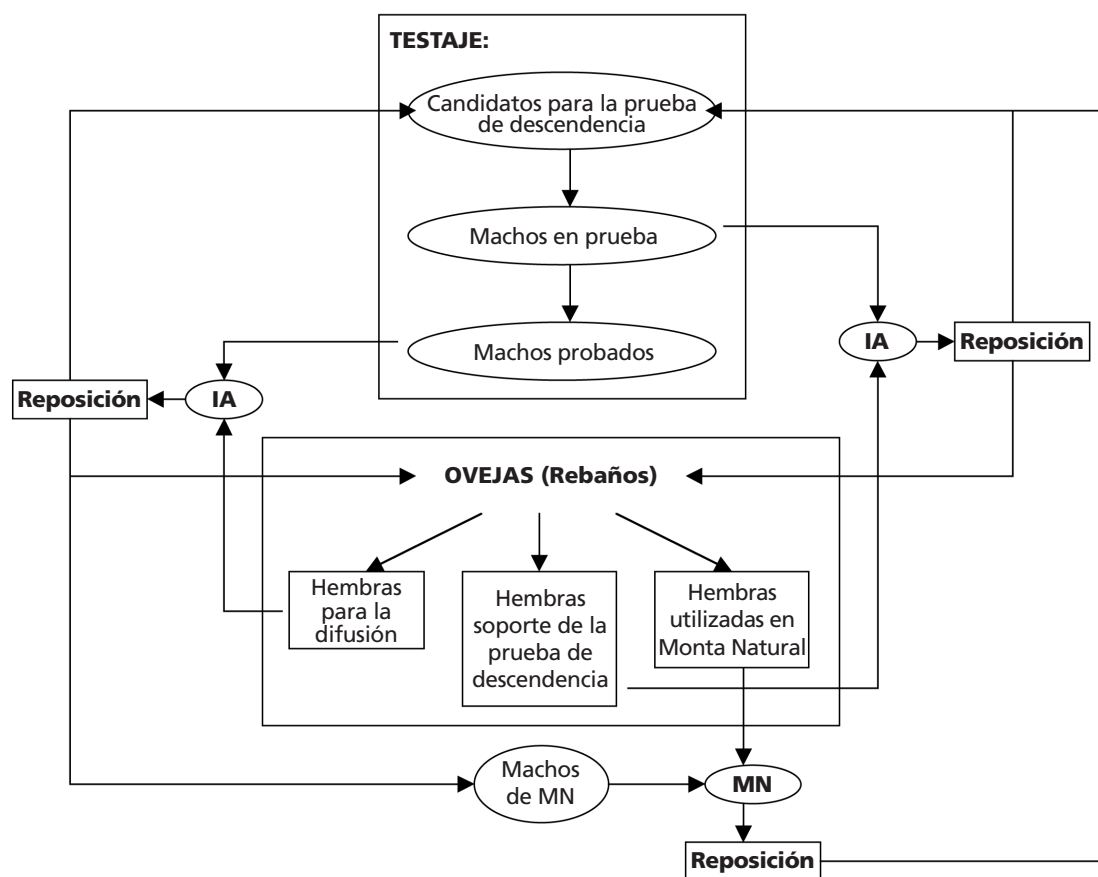


Figura 1. Esquema de Selección simulado.
 Figure 1. Breeding Program simulated.

Los animales elegidos como candidatos para las futuras pruebas de descendencia han sido aquellos que han presentado los mejores valores BLUP, seleccionados entre todos los corderos de una misma paridera,

con el fin de evitar el incremento excesivo de la consanguinidad que se produciría al escoger únicamente a los animales nacidos de machos probados. Al finalizar las pruebas de descendencia, se han seleccionado

los cuatro mejores animales (machos probados o machos élite), que han pasado a formar parte del depósito de sementales de la raza, además de ser utilizados en las inseminaciones de difusión. La conexión de las ganaderías simuladas se ha efectuado con los machos de inseminación (probados y en prueba de descendencia), siguiendo el mismo esquema de conexión realizado por Analla (1996) en la raza Segureña.

Se ha considerado una reposición anual del rebaño de 20%. Al tratarse de un sistema de 3 partos cada 2 años, en cada época de parto (invierno, primavera y otoño) se renueva el 13% de las hembras, reponiéndose un total de 396 hembras para el conjunto de las ganaderías simuladas. El 25% de las hembras de reposición se utilizan para la difusión del progreso genético (se cruzan con los machos probados) y el 75% restante se utilizan como soporte de las pruebas de descendencia (se aparean con los machos en prueba), siendo empleadas 96 hembras para la difusión y 300 para las pruebas de testaje.

Las pruebas de descendencia realizadas en la raza Ile de France se basan, generalmente, en el cruce de 1 macho con 18-22 hembras, obteniendo una media de 33 hijos por macho. En concordancia con los datos reales de la Asociación y dado que el número de hembras soporte de la prueba de descendencia es constante (300 hembras), las estrategias simuladas y comparadas en este estudio han sido las siguientes: 5 machos en prueba de descendencia con 60 hembras cada uno, 10 machos con 30 hembras cada uno, y 20 machos con 15 hembras cada uno. La comparación de las estrategias simuladas se ha realizado tomando como referencia la ganancia genética alcanzada al final del proceso de selección (diferencia entre el valor aditivo medio de la población simulada en la primera y última generación), y aumento del coeficiente de consanguinidad

medio obtenido al final del proceso selectivo simulado.

El carácter simulado ha sido el peso tipificado a 70 días de edad (PT70), que representa el peso aproximado a partir del cual los animales son sacrificados. Además, es el carácter elegido como criterio de selección de entrada de los animales en el proceso de testaje realizado en esta raza. El modelo de simulación utilizado ha sido el siguiente:

$$y_{ijklmno} = \mu + TP_i + S_j + EM_k + R_l + A_m + E_n + a_o + e_{ijklmno}$$

donde y es el PT70, μ es la media general, TP_i es el tipo de parto, S_j es el sexo del cordero, EM_k es la edad de la madre, R_l es el rebaño, A_m es el año de parto, y E_n es la estación de parto; a es el valor aditivo y e es el valor ambiental temporal, para PT70. Para la simulación de PT70 se han usado las varianzas aditiva ($\sigma_a^2=5,40$) y ambiental temporal ($\sigma_e^2=16,50$) calculadas con un modelo animal simple. Los efectos fijos incluidos en el modelo influyeron de forma significativa sobre los caracteres de crecimiento de los animales de raza Ile de France (Jiménez *et al.*, 1998), habiendo sido incluidos de forma sistemática en los modelos de valoración y simulación del estudio.

La simulación de los valores a y e se ha llevado a cabo mediante el procedimiento de Box y Muller (1958) de generación de variables aleatorias. La población base ha sido generada extrayendo una muestra al azar de una población infinita, de la siguiente manera: $a_i = v_1 \cdot \sigma_a$ y $e_i = v_2 \cdot \sigma_e$, donde a es el valor aditivo y e es el valor residual del carácter PT70. v_1 y v_2 son los valores tomados al azar, y obtenidos de una distribución normal típica, y σ_a^2 y σ_e^2 son las varianzas del valor aditivo y residual, respectivamente. La simulación de los individuos nacidos en las generaciones siguientes se ha realizado a partir de los valores aditivos y de los coeficientes de consanguinidad de sus pa-

dres, calculándose ésta última a través de la matriz de parentesco (Quaas, 1976):

$$a_i = \frac{1}{2}(a_p + a_m) + \sqrt{\frac{1}{2} \left[1 - \frac{F_p + F_m}{2} \right]} \cdot v_1 \sigma_a$$

siendo los subíndices p, m, e i el padre, la madre y el individuo respectivamente, y F el coeficiente de consanguinidad del padre y la madre de cada individuo. Finalmente, la selección de los animales se ha basado en las valoraciones obtenidas utilizando la metodología BLUP. Se ha usado un modelo animal aditivo simple, con los mismos efec-

tos fijos y valores para las componentes de varianza que los usados en la simulación.

Resultados y discusión

Los valores aditivos medios simulados (a) del peso tipificado a 70 días de edad (PT70) y la consanguinidad media simulada de la última generación aparecen en la tabla 1, junto con el error estándar para el conjunto de las 15 réplicas simuladas y el valor fenotípico del carácter obtenido al final del proceso selectivo.

Tabla 1. Valor aditivo, fenotipo y consanguinidad media simulada de la última generación del carácter peso tipificado a 70 días de edad (PT70), en cada uno de los criterios estudiados
Table 1. Additive, phenotypic and mean inbreeding value for the character 70-day weight in the last simulated generation for each studied criteria

Criterio simulado	Valor aditivo medio a	e.s.	Fenotipo PT70	Consanguinidad F
1 (5-60)	9,97 (8,81-10,67)	0,15	32,89 (31,68-33,63)	8,16
2 (10-30)	9,82 (9,10-10,81)	0,11	32,76 (32,22-33,77)	5,94
3 (20-15)	9,84 (9,09-10,77)	0,12	32,78 (32,00-33,79)	5,63

PT70: Peso tipificado a 70 días de edad (kg); a: valor aditivo de PT70 (kg); F: Consanguinidad de los animales nacidos en la última generación (%); e.s.: error estándar; Criterio simulado: 1-5 machos en prueba de descendencia con 60 hembras cada uno; 2-10 machos en prueba de descendencia con 30 hembras cada uno; 3-20 machos en prueba de descendencia con 15 hembras cada uno.

Aunque no se han detectado diferencias significativas entre las tres estrategias testadas, el criterio que considera 5 machos en prueba de descendencia con 60 ovejas cada uno (criterio 1) ha dado lugar a los mejores valores aditivos simulados al final del proceso selectivo (9,97 kg en la generación 18), alcanzando un progreso genético mayor. Los errores estándar obtenidos al final del proceso de selección y para el conjunto de las réplicas simuladas, se han encontrado en el rango de valores comprendido entre 0,11

y 0,15, correspondiendo los valores más bajos a las estrategias que han incluido un mayor número de machos en la prueba.

Sin embargo, considerando como criterio de comparación el nivel de consanguinidad alcanzado en la última generación simulada, se observa que los valores más elevados han correspondido a la estrategia que ha alcanzado los mayores valores aditivos (criterio 1) con porcentajes superiores al 8%, estando la consanguinidad próxima al 6%

(5,94 y 5,63%) en los criterios 2 y 3 respectivamente.

Tal y como ha ocurrido en los resultados obtenidos en la raza Ile de France, Villanueva *et al.* (1995) y Lewis y Simm (2000) encuentran altos índices de ganancia genética y grandes incrementos de la consanguinidad al utilizar estrategias que combinan un mayor número de hembras por macho. En la

raza Segureña (Analla y Serradilla, 1996; Analla *et al.*, 1997), donde los resultados descritos han sido similares a los obtenidos en este estudio, concluyen que las estrategias que utilizan un menor número de machos en prueba producen mayores niveles de consanguinidad dado que las hijas de estos machos son utilizadas como hembras de reposición, estando más emparentadas entre sí.

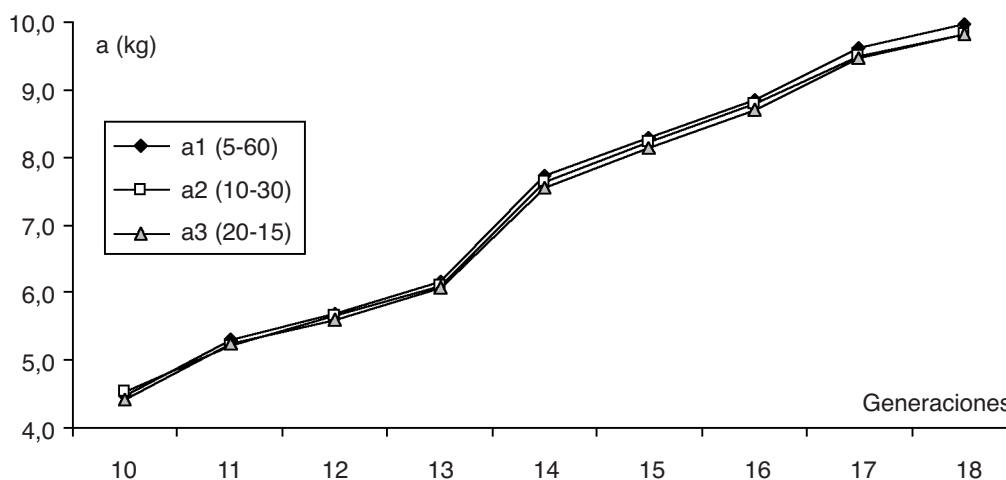


Figura 2. Evolución de los valores aditivos (a) medios simulados del carácter peso tipificado a 70 días de edad (PT70) en cada generación, y para los criterios: a1- 5 machos en prueba de descendencia con 60 hembras cada uno, a2- 10 machos en prueba de descendencia con 30 hembras cada uno, y a3- 20 machos en prueba de descendencia con 15 hembras cada uno.

Figure 2. Evolution of mean additive simulated values (a) of 70-day weight in each generation for the three criteria: a1. five males with 60 females each; a2. ten males with 30 females each; and a3. twenty males with 15 females each.

La evolución de los valores aditivos (a) simulados en cada una de las estrategias estudiadas (figura 2), ha resultado ascendente y paralela en los tres casos, no observándose diferencias significativas al final del periodo de selección, contrariamente a los resultados presentados por Analla y Serradilla (1996) donde se establece la posibilidad de

que métodos que no resultaron distintos en un número determinado de generaciones, realmente si lo sean si continúa la selección a lo largo del tiempo. En la raza Segureña se simularon 21 generaciones y se detectaron diferencias al final del proceso entre varios criterios, siendo posible observar nuevas variaciones con un par de genera-

ciones más. En la población de Ile de France, aunque la evolución ha sido paralela en las tres estrategias simuladas, en la generación 14 se observan variaciones que se acentúan a partir de la generación 16, por lo que la simulación de un mayor número de genera-

ciones podría suponer un aumento de las diferencias entre los distintos criterios. Sin embargo y dado que las variaciones entre los criterios han resultado pequeñas, sería necesario un alto número de generaciones más para apreciar estas diferencias.

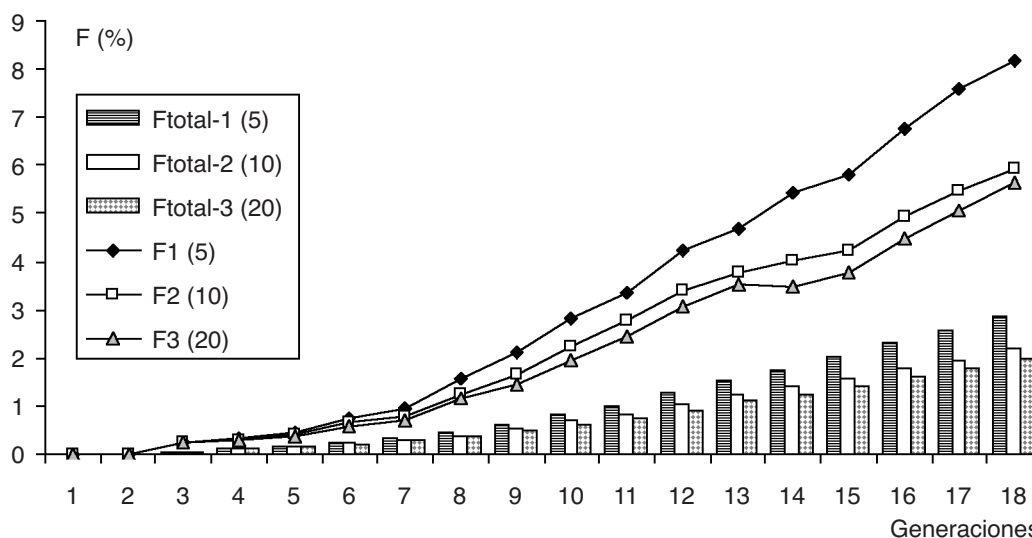


Figura 3. Evolución del coeficiente de consanguinidad medio de los animales nacidos (F) y presentes (Ftotal) en cada generación, y para los criterios: 1- 5 machos en prueba de descendencia con 60 hembras cada uno, 2- 10 machos en prueba de descendencia con 30 hembras cada uno, y 3- 20 machos en prueba de descendencia con 15 hembras cada uno.

Figure 3. Mean inbreeding coefficient evolution of animals born (F) and present (Ftotal) in each generation for the three criteria: 1. five males with 60 females each; 2. ten males with 30 females each; and 3. twenty males with 15 females each.

La evolución del coeficiente de consanguinidad medio de los animales simulados en cada generación (F) se representa en la figura 3. Se han encontrado diferencias altamente significativas ($P < 0,0001$) entre el criterio 1, que ha dado lugar a los niveles más elevados de consanguinidad, y los criterios 2 y 3, con valores para la consanguinidad inferiores, no detectándose diferencias entre estas dos últimas estrategias. Estos resultados han estado acordes a los obteni-

dos por Analla y Serradilla (1996), que no encontraron diferencias entre los métodos que utilizaron un menor número de hijas para las pruebas de testaje (32 y 42 hijas por macho). La evolución de la consanguinidad ha sido paralela en las tres estrategias simuladas, comenzando a detectarse diferencias entre ellas tras la generación 7, momento a partir del cual la consanguinidad ha experimentado una tendencia ascendente hasta el final de la selección.

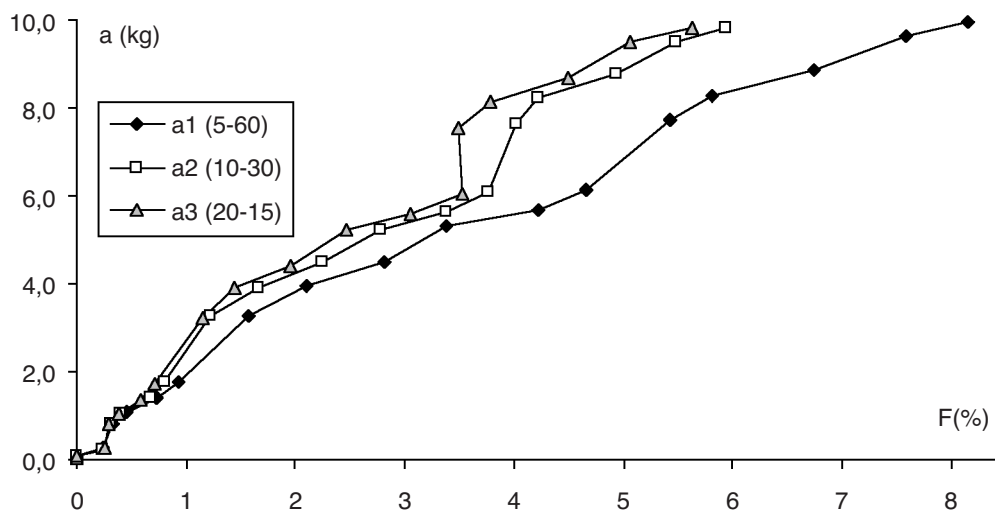


Figura 4. Evolución de los valores aditivos (a) medios simulados del carácter peso tipificado a 70 días de edad (PT70), en función del nivel de consanguinidad (F) y para los criterios: a1- 5 machos en prueba de descendencia con 60 hembras cada uno, a2- 10 machos en prueba de descendencia con 30 hembras cada uno, y a3- 20 machos en prueba de descendencia con 15 hembras cada uno.

Figure 4. Simulated mean additive values (a) of 70-day weight in relation to the inbreeding value (F) for the three criteria: a1. five males with 60 females each; a2. ten males with 30 females each; and a3. twenty males with 15 females each.

Comparando los valores aditivos simulados del peso tipificado a 70 días de edad obtenidos en las tres estrategias testadas y para los mismos niveles de consanguinidad (figura 4), no se han detectado diferencias importantes hasta niveles comprendidos entre el 1% y el 1,5% de consanguinidad, momento en el que comienzan a apreciarse algunas variaciones. Los criterios que consideran 10 y 20 machos en prueba de descendencia (criterios 2 y 3), han obtenido los mejores valores aditivos para el carácter simulado con niveles de consanguinidad inferiores al 6%. El método que ha considerado el mayor número de hembras (criterio 1) se ha encontrado en todo momento por debajo de los criterios 2 y 3, dando lugar a los menores valores aditivos en el rango comprendido entre el 1% y 6% de la consanguinidad. Tal y como se ha descrito anteriormente, la

estrategia 1 tiende a un mayor progreso genético al final del proceso selectivo, aunque con aumentos importantes de la consanguinidad (valores superiores al 8%).

Muchos de los estudios encaminados a optimizar la respuesta genética de los caracteres de importancia económica mediante técnicas de simulación (Quinton *et al.*, 1992; Villanueva *et al.*, 1995; Analla *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1999; Lewis y Simm, 2000) han encontrado, al comparar diversas estrategias de optimización, que los aumentos deseados en las ganancias genéticas han venido acompañados de aumentos importantes de los niveles de consanguinidad. Por tanto, parece necesario establecer un compromiso entre selección y consanguinidad. Controlar los incrementos de consanguinidad provocados por las diversas políticas de selección resulta importante y beneficioso

para los objetivos del sistema, si se logra sin afectar en demasía las ganancias genéticas deseadas o buscadas.

En este sentido, las estrategias y metodologías propuestas por diversos autores con el objetivo final de mantener o reducir los niveles de consanguinidad han ido evolucionado. Así, se ha pasado de estudios en los se han observado disminuciones de la respuesta a la selección (Nicholas y Smith, 1983; Goddard, 1987; Toro y Pérez-Enciso, 1990), a los que han conseguido reducciones de la consanguinidad con efectos mínimos sobre la ganancia genética (Brisbane y Gibson, 1994; Wray y Goddard, 1994). Lewis y Simm (2000) pudieron obtener niveles aceptables de consanguinidad (1% por generación o menos) cuando los esquemas se planificaron evitando cruces entre parientes, y se aumentó el número de ovejas en selección dentro de los rebaños. Villanueva *et al.* (1995) encontraron reducciones importantes de la consanguinidad actuando sobre las políticas de apareamiento de los machos y sobre la metodología de valoración de los mismos, sin comprometer en exceso las ganancias genéticas.

Actualmente, existen metodologías que permiten, no sólo, alcanzar un compromiso entre la respuesta genética y la consanguinidad, sino maximizar el progreso genético restringiendo los niveles de consanguinidad. Son métodos que se basan en la optimización de las contribuciones (Meuwissen, 1997), optimizando el número de individuos seleccionados y su descendencia para un valor de consanguinidad predeterminado. Los beneficios derivados de este tipo de aplicación han sido descritos por Avendaño *et al.* (2003) al evaluar las ganancias genéticas esperadas en dos poblaciones de ovino y bovino inglesas, frente al uso convencional de la selección por BLUP.

Dado el problema que se plantea y tomado como referencia el aumento de los niveles de consanguinidad con la selección, en la población de Ile de France la estrategia que considera un mayor número de hembras por macho (criterio 1) puede reflejar más rápidamente los efectos de la depresión por consanguinidad al producir un mayor incremento de los índices de consanguinidad. Los criterios 2 y 3 aparecen como candidatos a conseguir la optimización del esquema de selección en su política de apareamientos, ya que los grados de consanguinidad alcanzados al final del estudio y los incrementos por generación han resultado significativamente menores. En un futuro, se podría pensar en la utilización de la metodología de optimización de las contribuciones (Meuwissen, 1997) como medio de asegurar la respuesta a lo largo de un mayor número de generaciones.

Conclusiones

Cuando se ha considerado un mayor número de hembras por macho (5 machos en prueba de descendencia con 60 hembras cada uno) el aumento de los niveles de consanguinidad de la población ha resultado mayor. Dado que no se han producido diferencias significativas con relación a la ganancia genética, los métodos en los que se han testado 10 y 20 machos en prueba de descendencia con un menor número de hembras (30 y 15 hembras por macho) se establecen como las estrategias más adecuadas para la optimización del esquema de selección, al alcanzar niveles de consanguinidad significativamente inferiores. La elección final entre uno u otro criterio podría venir dada por la conveniencia de tener un mayor número de machos en prueba de descendencia, puesto que participan en la conexión de los rebaños, contribuyendo a

mejorar la precisión de las estimaciones de los valores genéticos, y en la difusión de la mejora genética, si una vez probados resultan animales mejorantes.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación recibida por parte del Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico (S.D.I.T.) de la Junta de Extremadura y los fondos FEDER. Gracias a la Asociación Española de Criadores de Ovinos Precoces (A.E.C.O.P.) por aportar los datos para realizar este trabajo, y al Doctor Mohamed Analla por ceder generosamente los programas de simulación base para realizar este estudio.

Bibliografía

- Analla M, 1996. Valoración genética de reproductores y selección de ovino Segureño: un estudio de simulación. Ph. D. Thesis, University of Cordoba, Spain.
- Analla M, Montilla JM, Serradilla JM, 1998. Analyses of lamb weight and ewe litter size in various lines of Spanish Merino Sheep. *Small Rum. Res.*, 29, 255-259.
- Analla M, Muñoz-Serrano A, Serradilla JM, 1997. Note on the optimum number of daughters per sire to maximize the genetic progress for litter size in Segureña sheep. *Livest. Prod. Sci.*, 52, 229-232.
- Analla M, Serradilla JM, 1996. Mejora Genética del Ovino Segureño. *ITEA 92A(3)*, 57-74.
- Avenidaño S, Villanueva B, Woolliams JA, 2003. Expected increases in genetic merit from using optimized contributions in two livestock populations of beef cattle and sheep. *J. Anim. Sci.*, 81, 2964-2975.
- Box GEP, Muller ME, 1958. A note on the generation of random normal deviates. *Annals of Math. Stat*, 29, 610-611.
- Brisbane JR, Gibson JP, 1994. Balancing selection response and rate of inbreeding by including genetic relationships in selection decisions. *Proc. 5th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.*, 19, 135-138. Guelph.
- Burrow HM, 1993. The effects of inbreeding in beef cattle. *Anim. Breed. Abst.*, 61, 737-751.
- Caballero A, Santiago E, Toro MA, 1996. Systems of mating to reduce inbreeding in selected populations. *Anim. Sci.*, 62, 431-442.
- Díaz C, Toro MA, Rekaya R, 1999. Comparison of restricted selection strategies: an application to selection of cashmere goats. *Livest. Prod. Sci.*, 60, 89-99.
- Espejo M, Jiménez R, Izquierdo M, Costela A, 1996. Resultados de la primera prueba de valoración por descendencia (Progeny Test) realizada con las razas de Ovinos Precoces. *FEAGAS*, 10, 81-85.
- Espinosa de los Monteros E, Jiménez MA, 2001. Presentación del I Catálogo de Animales valorados genéticamente. *FEAGAS*, 19, 97-100.
- Fernández B, Toro M, Caballero A, 1998. Estrategias de selección para controlar la consanguinidad en programas de mejora. *ITEA*, 94A (3), 334-339.
- Goddard ME, 1987. Policy of selecting bulls to breed bulls. *Anim. Prod.*, 44, 29-38.
- Grundy B, Villanueva B, Woolliams JA, 2000. Dynamic selection for maximizing response with constrained inbreeding in schemes with overlapping generations. *Anim. Sci.*, 70, 373-382.
- Hudson GFS, Shaeffer LR, Wilton JW, 1980. Alternative progeny testing programs for weaning weight and ease of calving in beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 60, 609-620.
- Jiménez MA, Izquierdo M, Espejo M, Albardonedo D, 1998. Evolución del número de corderos y de ganaderías inscritos al esquema de selección de la raza Ile de France de 1992 a 1997, y

- análisis de los factores ambientales que influyen en el peso y crecimiento de los corderos. Actas de las XXIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 477-481, Diputación Foral de Álava, Vitoria (España).
- Lamberson WR, Thomas DL, 1984. Effects of inbreeding in sheep: A review. *Anim. Breed. Abst.*, 52, 287-297.
- Lewis RM, Simm G, 2000. Selection strategies in sire referencing schemes in sheep *Livest. Prod. Sci.*, 67, 129-141.
- López I, Silió L, 1992. Evolución del censo, de la estructura poblacional y de la consanguinidad de un núcleo cerrado de ganado porcino. *ITEA*, 88A(1), 76-87.
- Meuwissen THE, 1997. Maximizing the Response of Selection with a Predefined Rate of Inbreeding. *J. Anim. Sci.*, 75, 934-940.
- Meuwissen THE, Sonesson A, 1998. Maximizing the Response of Selection with a Predefined Rate of Inbreeding: Overlapping Generations. *J. Anim. Sci.*, 76, 255-2583.
- Nicholas FW, Smith C, 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.*, 36, 341-353.
- Nimbkar C, Wray N, 1991. An investigation of the use of sire referencing in genetic improvement in beef cattle. *Anim. Prod. Abst.*, 52, 567.
- Pariacote F, Van Vleck LD, Macneil MD, 1998. Effects of Inbreeding and Heterozygosity on Prewaning traits in a closed population of Herefords under selection. *J. Anim. Sci.* 76, 1303-1310.
- Quaas RL, 1976. Computation the diagonal elements and inverse of a large numerator relationship matrix. *Biometrics*, 32, 949-953.
- Quinton M, Smith C, Goddard ME, 1992. Comparison of Selection methods at the same level of Inbreeding. *J. Anim. Sci.* 70, 1060-1067.
- Sánchez Belda A, 1986. Merinos Precoces y Razas afines a España. Asociación Española de Criadores de Ovinos Precoces, 447 pp. Madrid (España).
- Sierra I, 1989. Cruzamiento en la especie ovina. III Mejora de la producción de carne. *OVIS*, 4, 47-73.
- Sonesson A, Meuwissen THE, 2000. Mating schemes for optimum contribution selection with constrained rates of inbreeding. *Genet. Sel. Evol.*, 32, 231-248.
- Toro MA, Pérez-Enciso M, 1990. Optimization of selection response under restricted inbreeding. *Genet. Sel. Evol.*, 22, 93-107
- Van Wyk JB, Erasmus GJ, Konstantinov KV, 1993. Inbreeding in the Elsenburg Dormer sheep stud. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 23, 77-80.
- Villanueva B, Simm G, Woolliams JA, 1995. Genetic progress and inbreeding for alternative nucleus breeding schemes for beef cattle. *Anim. Sci.*, 61, 231-239.
- Wiener G, Lee GJ, Woolliams JA, 1992. Effects of rapid inbreeding and of crossing of inbred lines on conception rate, prolificacy and ewe survival in sheep. *Anim. Prod.*, 55, 115-121.
- Wray NR, Goddard ME, 1994. Increasing long-term response to selection. *Genet. Sel. Evol.*, 26, 431-451.
- Wray NR, Thompson R, 1990. Advances in selection theory. En: W.G. Hill, R. Thompson and J.A. Woolliams (Editor), *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.* XIII, 167-176. W.G. Hill.

(Aceptado para publicación el 7 de junio de 2005)

Metodología operativa para la obtención del coeficiente de cultivo desde imágenes de satélite

A. Cuesta*, A. Montoro***, A.M. Jochum**, P. López***, A. Calera*

* Grupo de Teledetección y SIG. (IDR). Universidad de Castilla-La Mancha. Campus universitario s/n, 02071 Albacete.

** ALFAclima; Avenida de España, 9, 6ºD, 02002 Albacete.

*** Instituto Técnico Agronómico Provincial, Carretera de Madrid s/n, 02006 Albacete.

e-mail: Andres.Cuesta@uclm.es

Resumen

La evapotranspiración de un cultivo se calcula usualmente mediante el procedimiento denominado "en dos pasos", consistente en el producto del coeficiente de cultivo (K_c) por la evapotranspiración de referencia (E_{To}), $K_c \times E_{To}$, recomendado por FAO. Diversos trabajos anteriores han mostrado la posibilidad de estimar el K_c a partir del denominado índice de vegetación normalizado, NDVI, que se calcula mediante una combinación algebraica de la reflectividad espectral de la cubierta vegetal en las bandas del rojo e infrarrojo cercano. En este trabajo presentamos una metodología operativa para la obtención de mapas de valores del coeficiente de cultivo a partir de imágenes de satélite de alta resolución espacial, que permiten seguir individualmente la evolución del K_c en cada parcela. El procedimiento que se describe permite la obtención del así denominado K_c NDVI, y se basa en la acreditada relación lineal existente entre el NDVI y el coeficiente de cultivo basal. Dicha metodología ha sido validada con los resultados de las campañas llevadas a cabo en 2002 y 2003 en la zona piloto de Barrax (España) desarrolladas dentro del proyecto DEMETER para los siguientes cultivos: cebada, trigo, maíz, adormidera, remolacha, alfalfa, guisante, patata, cebolla y ajo. Los resultados muestran la aplicabilidad de la metodología aquí descrita en los cultivos que alcanzan alta cobertura vegetal, mientras que subestima el coeficiente de cultivo en aquellos que alcanzan baja cobertura vegetal en la etapa de máximo desarrollo.

Palabras clave: evapotranspiración, índice de vegetación, cobertura vegetal

Summary

Operative Methodology to Obtain the Crop Coefficient from Satellite Images

Crop evapotranspiration is usually calculated using the *crop coefficient* (K_c) \times *reference evapotranspiration* (E_{To}) methodology, $K_c \times E_{To}$, recommended by FAO. In the present work K_c have been estimated from the Normalized by Difference Vegetation Index, NDVI, derived from the vegetation canopy spectral reflectance in the red and infrared bands. We present an operative methodology to obtain crop coefficient values maps from high spatial resolution satellite imagery. Using a temporal imagery sequence we can obtain K_c temporal evolution monitoring of each plot. The described procedure enable us to obtain the denominated K_c NDVI, and it's based in the well known lineal relationship between the NDVI and the basal crop coefficient. This methodology have been validated with the results of the 2002 and 2003 campaigns in the pilot zone of Barrax (Spain) developed into DEMETER project for the following crops: barley, wheat, maize, opium poppy, sugar beet, alfalfa, bean, potato, onion and garlic. The results show the described methodology applicability in those crops that reach high effective full cover, but underestimate the crop coefficient in those crops that reach low effective full cover in the maximum growing stage.

Key words: evapotranspiration, vegetation index, vegetation canopy

Introducción

La evapotranspiración de un cultivo puede ser calculada usando el coeficiente de cultivo (K_c , ec. 1) definido como el cociente entre la evapotranspiración del cultivo en condiciones óptimas (ET_c) y la evapotranspiración de referencia (ET_0). Este coeficiente integra el efecto de características que distinguen la evapotranspiración de un cultivo de la de la superficie de referencia. Los factores que determinan los coeficientes de cultivo son el tipo de cultivo, clima, evaporación del suelo, y el estado de crecimiento y desarrollo (Allen et al., 1998; Bailey, 1990).

$$K_c = \frac{ET_c}{ET_0} \quad (\text{Ec. 1})$$

La metodología propuesta por Wright (1982) divide el K_c en dos coeficientes separados, uno para la transpiración del cultivo (K_{cb} , coeficiente de cultivo basal) y otro para la evaporación del suelo (K_e). El coeficiente de evaporación del suelo, K_e , describe la componente de evaporación de la ET. Cuando la capa superficial del suelo está húmeda, después del riego o lluvia, K_e es máximo. La estimación del K_e requiere el conocimiento del balance de agua en el suelo (Allen et al., 1998). El coeficiente de cultivo basal es el debido a la transpiración, donde la componente de evaporación del suelo de la ET es mínima debido a que la capa superficial del suelo está seca pero hay disponible una adecuada humedad del suelo en la zona radicular del cultivo. De esta forma ET_c quedaría:

$$ET_c = [K_{cb} + K_e] \cdot ET_0 \quad (\text{Ec. 2})$$

Jackson et al. (1980) encontraron relación entre el coeficiente de cultivo medio (K_c) con el índice de vegetación perpendicular (PVI) para trigo. Heilman et al. (1982) inves-

tigaron la relación entre el porcentaje de cobertura y el índice de vegetación perpendicular basado en reflectividad (PVI) para alfalfa. Neale et al. (1989) relacionaron la reflectividad de la cubierta del cultivo con el coeficiente de cultivo basal para maíz, desarrollando una técnica operacional para la estimación de la ET del cultivo. El coeficiente de cultivo basado en reflectividad fue derivado mediante la transformación del índice de vegetación normalizado (NDVI) usando medidas del porcentaje de sombreado y del área foliar para establecer la cobertura efectiva máxima (EFC) y relacionarla con el coeficiente de cultivo basal. La ecuación obtenida para dos zonas experimentales (Fruita y Greely, Colorado) usando alfalfa como superficie de referencia es (Neale et al., 1989):

$$K_{cb \text{ NDVI, alf}} = 1,181 * \text{NDVI} - 0,026 \quad (\text{Ec. 3})$$

González-Piqueras et al. (2003), durante las campañas experimentales del proyecto DEMETER, han obtenido, para maíz la siguiente ecuación para el cálculo del coeficiente de cultivo basal basado en reflectividad a partir del NDVI usando festuca como superficie de referencia:

$$K_{cb \text{ NDVI, FAO}} = 1,37 * \text{NDVI} - 0,017 \quad (\text{Ec. 4})$$

Para poder comparar la ecuación 3 en la que se ha usado alfalfa como superficie de referencia con la ecuación 4 en la que se ha usado festuca como superficie de referencia hemos transformado la ecuación 3 multiplicando por un factor de 1.15 los valores K_{cb} basados en alfalfa pasando a ser valores K_{cb} basados en festuca, como se describe en ASCE 28 (1996).

$$K_{cb \text{ NDVI, FAO}} = 1,36 * \text{NDVI} - 0,031 \quad (\text{Ec. 5})$$

La ecuación 5 y la ecuación 4 muestran la relación lineal entre el NDVI y el K_{cb} . Algunos estudios más, también han utilizado el NDVI para predecir el K_c (Bausch y Neale,

1989; Bausch, 1993, 1995; Choudhury *et al.*, 1994).

En este trabajo presentamos una metodología para la obtención del coeficiente de cultivo a partir de imágenes de satélite directamente desde el NDVI, llamado "Kc-NDVI", basada en la relación lineal que describen las ec. 4 y 5 entre el NDVI y el coeficiente de cultivo basal.

Material y Metodología

Las 21 imágenes utilizadas han sido adquiridas por los sensores Landsat5-TM y Landsat7-TM, de las cuales 8 han sido adquiridas en la campaña del año 2002, y 13 en la campaña del año 2003. Las características básicas de las imágenes son: campo de visión: 185 x 185 Km²; resolución temporal: de 16 días y una resolución espacial de 30 m, la cual permite el seguimiento de parcelas superiores a una hectárea. La gran mayoría de las parcelas de la zona de estudio superan con creces este tamaño mínimo. En relación con la frecuencia temporal es de resaltar que la zona piloto, en donde se hallan las parcelas muestreadas, es el área de solape de imágenes LANDSAT adyacentes con lo que se dispone en este área de una frecuencia temporal de 8 días. Los intervalos de longitud de onda de ambos sensores en las bandas en las que se estima la reflectividad para calcular el NDVI son [0.63, 0.69 μm] en el rojo, banda 3, y [0,76; 0,90 μm] en el infrarrojo cercano, banda 4. El cálculo se realiza mediante la ecuación:

$$\text{NDVI} = (\text{IRC}-\text{R})/(\text{IRC}+\text{R}) \quad (\text{Ec. 6})$$

donde IRC es la reflectividad en el infrarrojo cercano, y R es la reflectividad en el rojo.

El procesado de las imágenes de satélite ha consistido en la corrección geométrica, georeferenciación en la proyección UTM, datum

europeo, cálculo de reflectividades aparentes y cálculo de los NDVI a partir de ellas. La utilización del NDVI supone un primer paso de corrección atmosférica. Las imágenes usadas en este trabajo han sido analizadas con superficies invariantes (Calera, 2000) para comprobar que la influencia de la atmósfera es pequeña.

La metodología descrita aquí ha sido validada con los resultados de las campañas 2002 y 2003 en la zona piloto de BARRAX (ESPAÑA) dentro del proyecto DEMETER (Demeter, 2002) para los siguientes cultivos: cebada, trigo, maíz, adormidera, remolacha, alfalfa, guisante, patata, cebolla y ajo. Para ello se han seleccionado y seguido en campo un conjunto de cerca de 600 parcelas de los diferentes cultivos con una superficie total de 11.000 ha. Su distribución espacial y sus características se muestran en la figura 1 y en la tabla 1, respectivamente. Los valores de Kc experimental (datos de campo) de estas 600 parcelas son valores estimados mediante seguimiento semanal en campo de la evolución fenológica de los cultivos por parte de los técnicos del Servicio de Asesoramiento de Riegos de Albacete (SARA), que cuenta con una experiencia de más de 15 años en esta tarea (SantaOlalla *et al.*, 2003). En estas parcelas los agricultores se comprometen a seguir las recomendaciones del SARA, con el objetivo de que los cultivos se encuentren en condiciones óptimas. Para cada una de estas parcelas se ha obtenido, para cada fecha en que disponemos de imagen el valor medio de NDVI derivado de las imágenes de satélite. De entre estas 600 parcelas y sobre un grupo de 17 parcelas escogidas con diferentes cultivos se ha medido, en la campaña del año 2003, la fracción de cobertura vegetal, f_v , a partir de fotografías digitales siguiendo la metodología descrita por Calera *et al.* (2001).

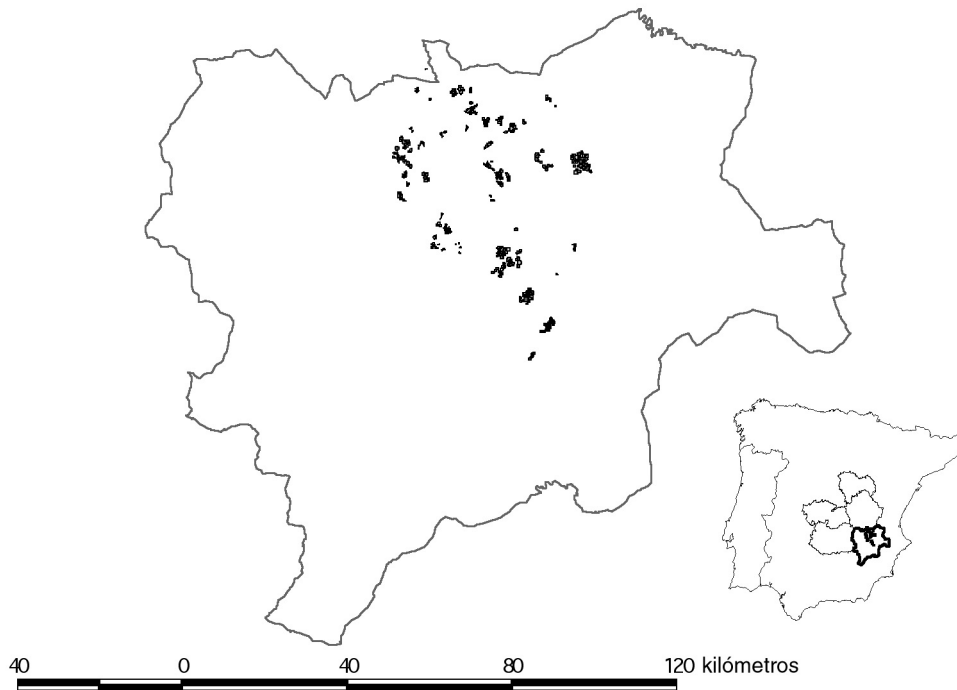


Figura 1. Mapa de localización de las parcelas seleccionadas para las campañas 2002 y 2003. La zona piloto abarca un área de cerca de 2.500 km², y el total de las superficies muestreadas en las campañas de 2002 y 2003 asciende a cerca de 110 km².

Figure 1. Location map of the selected plots for the 2002 and 2003 campaigns. The pilot zone has a 2,500 Km² area, and the total identified area extent in the 2002 and 2003 campaigns is 110 Km².

El cálculo del valor medio del NDVI para cada parcela se ha realizado en dos fases. En primer lugar se ha procedido a obtener un mapa vectorial con la delimitación de cada una de las parcelas en seguimiento en campo, para lo cual se ha partido del catastro digital de la propiedad rústica. En segundo lugar se ha realizado el cruce entre el mapa raster de NDVI y la capa de parcelas la cual se ha obtenido según el procedimiento anteriormente descrito, o-

peración de cruce realizada mediante tecnología de Sistemas de Información Geográfica. Dicho cruce permite asignar a todas y cada una de las parcelas el valor medio del NDVI correspondiente a esa imagen. Operando de esta manera, se ha obtenido el valor promedio y la desviación típica del NDVI para todas y cada una de las parcelas de un mismo tipo de cultivo para todas las imágenes disponibles.

Tabla 1. Número de parcelas seguidas en campo y superficie total de las mismas por cultivo y año
 Table 1. Number and total extent of the supervised in field plots by crop and year

Cultivo	N° de parcelas muestreadas			Superficie (ha)		
	2002	2003	Total	2002	2003	Total
Adormidera	17	26	43	407	693	1.100
Ajo	5	28	33	100	345	445
Alfalfa	26	36	62	489	902	1.390
Cebada	27	54	81	611	703	1.314
Cebolla	11	10	21	123	264	388
Guisante	5	20	25	68	377	444
Maíz	55	88	143	994	1.528	2.522
Maíz dulce	0	13	13	0	253	253
Patata	0	5	5	0	135	135
Remolacha	14	21	35	250	346	596
Trigo	39	73	112	595	1.395	1.990
Otros	5	14	19	71	207	278
Total	204	388	592	3.708	7.148	10.855

Metodología para Derivar el Mapa de Kc desde Imagen de Satélite

Aproximación Coeficiente de Cultivo Dual-NDVI

El coeficiente de cultivo viene dado de acuerdo con Wright (1982), por

$$Kc = Kcb + Ke \quad (\text{Ec. 7})$$

La existencia de una robusta relación lineal entre el Kcb y el NDVI, tal y como se menciona en la introducción, nos permite derivar una relación para ser utilizada directamente desde las imágenes de satélite. Sin embargo, no podemos sustituir directamente la relación Kcb-NDVI descrita con la ec. 4 ya que ha sido obtenida mediante radiometría de campo, en la que el efecto de la atmósfera es despreciable, y los valores de NDVI para cada parcela han sido calculados desde las imágenes de satélite no corregidas atmosféricamente. El análisis de los valores de NDVImax y NDVImin que se obtienen a partir de la secuencia temporal de las imágenes de satélite nos permite

hacer corresponder estos valores con aquellos de Kcb que corresponden al máximo de cobertura y al de suelo desnudo respectivamente, estimados estos últimos según Allen et al. (1998) y que se muestran en la tabla 2. Apoyándonos en la existencia de una relación lineal Kcb-NDVI, podemos obtener, desde los valores mostrados en la tabla 2, la relación lineal

$$K_{cb} = 1,5625 * NDVI - 0,1 \quad (\text{Ec. 8})$$

que puede ser utilizada en la secuencia temporal de imágenes de satélite. Es de resaltar que los valores de NDVImax y NDVImin han permanecido constantes para todas las imágenes utilizadas en este estudio, y se han utilizado como valores de referencia para realizar el control de calidad de las imágenes de satélite

La componente de evaporación de suelo, Ke, está relacionada con la fracción de suelo desnudo y depende fuertemente de su estado de humedad. El sistema de riego (por superficie, aspersión, goteo, etc.) y la frecuencia de riego y la lluvia, junto con el tipo

Tabla 2. Valores promedio a escala de parcela máximos y mínimos de NDVI observados en las imágenes de satélite utilizadas en este trabajo, junto con los valores promedio de parámetros biofísicos asociados a los cultivos

Table 2. Maximum and minimum NDVI averaged values at plot scale observed in the satellite images used in this work, and the biophysic parameters associated to the crops average values

	NDVI	Kcb	Kc
Mínimo	0,16	0,15	0,4
Máximo	0,80	1,15	1,2

y fase del cultivo, son los factores que determinan el tiempo de las diferentes fases de secado y por tanto del ritmo de evaporación del suelo.

Se propone una primera aproximación para calcular la componente K_e , en la forma

$$K_e = (1 - f_c) * \beta \quad (\text{Ec. 9})$$

en la que f_c es la fracción de cobertura vegetal verde, siendo por tanto $(1-f_c)$ la fracción de suelo desnudo, y donde β es un parámetro que permite reflejar el estado promedio evaporativo del suelo desnudo.

Un buen estimador de la fracción de cobertura vegetal verde, f_c , (y por tanto, de la fracción de suelo desnudo, $1 - f_c$), es el NDVI, ya que está linealmente relacionado con la f_c (Calera et al., 2001; Carlson y Ripley, 1997; Jochum et al., 2003). Como resultado del análisis de la relación entre los valores de NDVI de las parcelas donde se han realizado medidas en campo de f_c (figura 2), para los cultivos de alfalfa, remolacha, ajo y cebolla (representativos de cultivos con diferente porcentaje de cobertura efectiva máxima) y en diferentes fases fenológicas, asumimos una relación lineal entre el NDVI y f_c común para todos estos cultivos en la forma:

$$f_c = 1,318 * \text{NDVI} - 0,1877 \quad (\text{Ec. 10})$$

El parámetro β se puede estimar empíricamente como

$$\beta = K_{c,\text{ini}} - K_{cb,\text{ini}} \quad (\text{Ec. 11})$$

donde $K_{c,\text{ini}}$ y $K_{cb,\text{ini}}$ son los valores del coeficiente de cultivo y del coeficiente de cultivo basal correspondientes al suelo desnudo. Los valores de $K_{c,\text{ini}}$ y $K_{cb,\text{ini}}$ pueden ser estimados, bien a partir de datos promedio tomados de la bibliografía o calculados con las ecuaciones desarrolladas al efecto para adaptarlos a las condiciones propias del cultivo y de la frecuencia de riego (Allen et al., 1998) o de información local. Así, β es un parámetro que depende del cultivo, asociado a la frecuencia y sistema de riegos, y del estado de crecimiento del cultivo.

Aproximación Directa Coeficiente de Cultivo-NDVI

Si consideramos un valor típico de $K_{c,\text{ini}}$ igual a 0.4 y un valor de $K_{cb,\text{ini}}$ igual a 0,15, que en este caso es común a todos los cultivos estudiados (Allen et al., 1998), el valor de β es 0,25. Adoptando este valor y combinando las ecuaciones 7, 8, 9 y 10, obtenemos una relación general Kc-NDVI dada por

$$K_c = 1,233 * \text{NDVI} + 0,197 \quad (\text{Ec. 12})$$

Podemos obtener una relación Kc-NDVI operando de forma más directa: considerando una relación lineal entre el NDVI máximo y el máximo Kc (a cobertura efectiva completa), con el NDVI de suelo desnudo y el Kc correspondiente a suelo desnudo respectivamente. Usando los valores correspondientes de la tabla 2 obtenemos la ecuación:

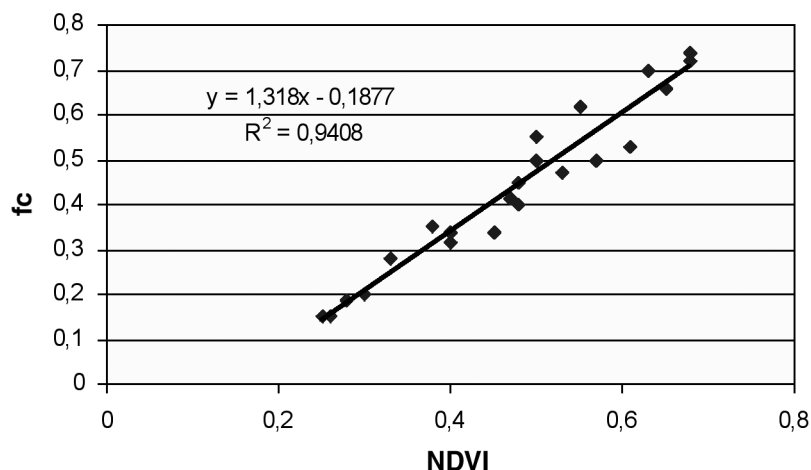


Figura 2. Relación entre la fracción de cobertura vegetal medida en campo con los índices de vegetación medidos desde el satélite en varias parcelas con diferentes cultivos.
 Figure 2. Relationship between green fraction cover measured in field and the vegetation index measured from the satellite in several plots with different crops.

$$Kc = 1,25 * NDVI + 0,2 \quad (\text{Ec. 13})$$

Las ecuaciones 12 y 13 son muy similares. Por su simplicidad asumimos la ecuación 13 como la operacional para obtener el coeficiente de cultivo del NDVI calculado utilizando las reflectividades aparentes desde las imágenes LANDSAT o bien procedentes de imágenes de otros sensores intercalibrados con LANDSAT tal y como se propone en Martínez et al. (2004).

Debemos apuntar que la ecuación 13 es aplicable para las fases inicial, de crecimiento y meseta solamente. La aplicación en la última fase requiere, a priori, una ligera corrección ya que en el uso del NDVI para estimar la fc se refleja la respuesta de la vegetación verde, no siendo así con la vegetación seca. Esto puede introducir un error a la hora de estimar el Ke , ya que con esta metodología, en la fase final, se confunde el papel del suelo con el de la vegetación seca, cuando la evaporación de un suelo desnudo regado es mayor que la de un suelo cubierto de vegetación seca. Por lo tanto, intentamos corregir

este efecto manteniendo un Ke constante para toda esta fase igual el Ke correspondiente con el Ke de la fase de meseta (fc máxima y, por tanto, Ke mínimo). Asumimos un valor constante de 0.8 para cobertura vegetal verde (tabla 2) y combinando las ecuaciones 8 y 9, obtenemos:

$$Kc = 1,5625 * NDVI - 0,05 \quad (\text{Ec. 14})$$

En resumen, las ecuaciones operacionales serán la ecuación 13 para las fases inicial, desarrollo y media, y la ecuación 14 para la fase final.

No obstante, estudios posteriores nos han hecho ver que en las recomendaciones del SARA los valores estimados para esta última fase en los cultivos analizados en este trabajo se asemejan más a los valores de Kc estimados usando la ecuación 13 también en la fase final que los obtenidos a partir de la ecuación 14 para esta misma fase. Es de notar que las ec. 13 y 14 proporcionarán el valor del coeficiente de cultivo de cualquier superficie como si ésta estuviera en condiciones óptimas; una

forma de visualizar el mapa de Kc que así obtendríamos desde la imagen sería aquel que correspondería a toda la superficie considerada tras una intensa lluvia, después que se secase la parte más superficial del suelo.

Resultados y Discusión

La evolución temporal de los NDVI de algunos de los cultivos mencionados anteriormente, y la curva de Kc derivada de estos índices para estos cultivos tras aplicar las ecuaciones 13 y 14 se muestran en las figuras 3 y 4. En estas figuras se han representado las medias de los valores medios de $K_{c,NDVI}$ de todas las parcelas sembradas de un mismo cultivo y su correspondiente desviación estándar.

Comparando las dos campañas experimentales para cada cultivo dentro de un mismo gráfico observamos dos fenómenos: por un lado aparece un comportamiento muy simi-

lar en ambas campañas en los cultivos representativos de primavera, y por otra parte se muestra un adelanto en el crecimiento en los cultivos representativos de verano, como la remolacha y el maíz, en la campaña 2003, situación que puede ser consecuencia de la intensa ola de calor registrada en el mes de junio de ese mismo año.

La tabla 3 muestra la comparación entre los valores Kc estimados a partir de los NDVI usando la ecuación 13, y los valores para Kc,ini, Kc,med de Allen et al. (1998) genéricos para los cultivos analizados. A su vez se han incluido los Kc,ini y Kc,med adaptados a las condiciones locales mediante ensayos de lisimetría por el SARA y corregidos con la dilatada experiencia de este servicio.

Como se observa en la tabla 3, existe un buen ajuste para cultivos de alto porcentaje de cobertura efectiva completa aunque aparecen pequeñas diferencias en el Kc,ini, sobreestimando la relación Kc-NDVI ligeramente para los cultivos de primavera.

Tabla 3. Comparación entre los valores medios de Kc calculados a partir de NDVI usando la ecuación 13, y los valores para Kc,ini, Kc,med a partir de Allen et al. (1998) para los cultivos analizados
Table 3. Comparison between the averaged Kc values calculated from the NDVI using the eq. 13, and the values for Kc,ini, Kc,med from Allen et al. (1998) for the analyzed crops

Cultivo Crop	NDVI mín	NDVI max	Kc,ini Ec. 13	Kc,ini Allen et al. (1998)	Kc,med Ec.13	Kc,med Allen et al. (1998)
Alfalfa	0,16	0,80	0,4	0,40	1,20	1,20
Ajo	0,16	0,44	0,4	0,70 (0,40)*	0,75	1,00
Trigo	0,16	0,80	0,4	0,30	1,20	1,15
Cebada	0,16	0,80	0,4	0,30	1,20	1,15
Maíz	0,16	0,78	0,4	0,30 (0,40)*	1,17	1,20
Cebolla	0,16	0,53	0,4	0,70 (0,50)*	0,86	1,00
Guisante	0,16	0,80	0,4	0,40	1,20	1.00 (1,10)*
Remolacha	0,16	0,80	0,4	0.35 (0,40)*	1,20	1.20 (1,00)*
Adormidera	0,16	0,80	0,4	No existe referencia FAO (0,30)*	1,20	No existe referencia FAO (1,00)*

* Valores corregidos por el Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP) para la zona de estudio. Corrected values by Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP) for the pilot zone.

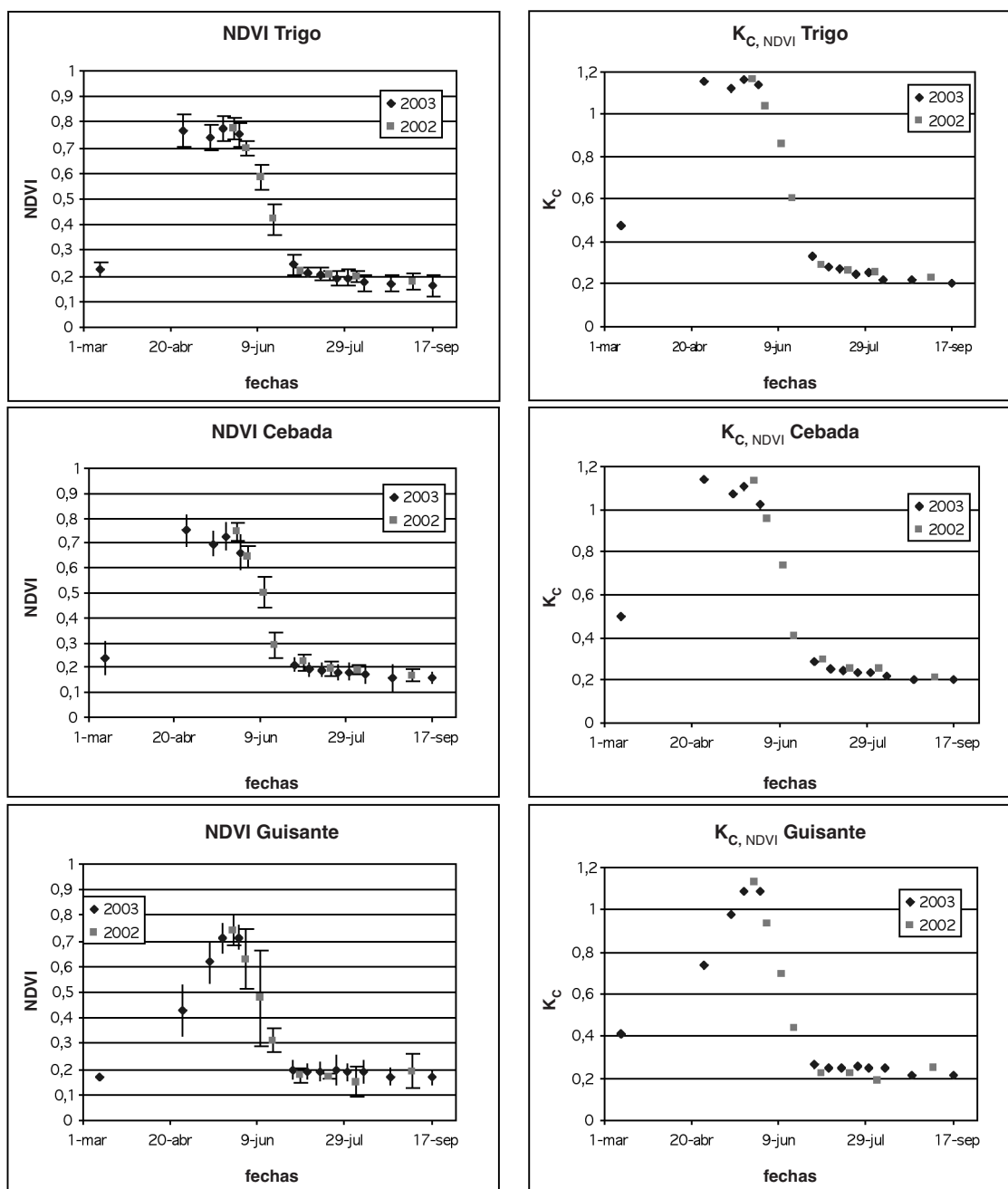


Figura 3. Evolución temporal de los NDVI de algunos de los cultivos representativos de primavera: cebada, trigo y guisante, y la curva de K_c derivada de estos índices mediante las ecuaciones 13 y 14.
 Figure 3. Temporal evolution of the NDVI of some of the representative spring crops: wheat, barley and pea, and the derived K_c curve from these NDVIs using the eq. 13 and 14.

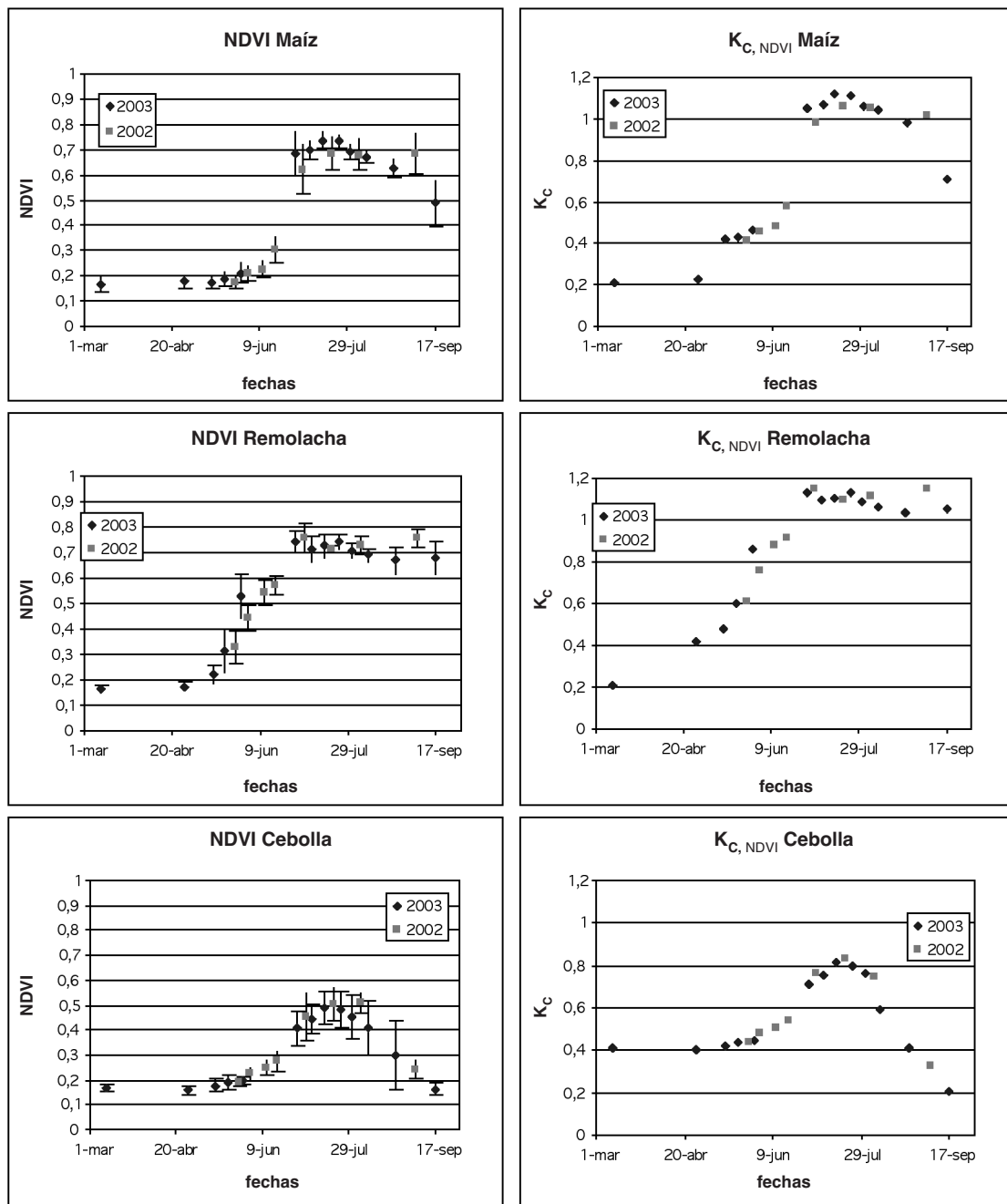


Figura 4. Evolución temporal de los NDVI de algunos de los cultivos representativos de verano: maíz, remolacha y cebolla, y la curva de K_c derivada de estos índices mediante las ecuaciones 13 y 14.
 Figure 4. Temporal evolution of the NDVI of some of the representative summer crops: maize, sugar beet and onion, and the derived K_c curve from these NDVIs using the eq. 13 and 14.

Aparecen desviaciones significativas de K_c ,med basados en NDVI y K_c ,med basados en FAO 56 en los cultivos ajo y cebolla, los cuales tienen bajo porcentaje de cobertura vegetal en su fase de máximo desarrollo, en contraste con el resto de cultivos estudiados. La mayor proporción de suelo desnudo en cultivos como ajo y cebolla pueden introducir y pueden reforzar efectos sobre el K_c relacionados con la frecuencia de riego, el sistema de riego utilizado, aspectos medioambientales y otros. Posteriores investigaciones necesitarán estudiar este comportamiento.

Conclusiones

La metodología K_c -NDVI anteriormente presentada permite derivar el coeficiente de cultivo desde las imágenes de satélite y proporciona un mapa de valores de K_c para cada imagen disponible. Los valores del coeficiente de cultivo representados en el mapa son aquellos que corresponden a condiciones ideales de crecimiento de la cubierta vegetal, circunstancia que asumimos se da en los cultivos en regadío en la zona de estudio, y que permite su comparación con otros valores obtenidos por procedimientos tradicionales. De esta forma, una secuencia temporal de imágenes permite el seguimiento de la evolución temporal del coeficiente de cultivo en sus diferentes fases de desarrollo en aquellos cultivos cuyo tamaño de parcela homogénea sea adecuado a la resolución espacial del sensor con el que se ha adquirido la imagen.

El valor del coeficiente de cultivo que se obtiene es el correspondiente a cada píxel de la imagen para la fecha en que fue adquirida. En el caso de una parcela, la extracción de información mediante herramientas SIG permite asignar un valor promedio a la parcela, y compararlo con otras

parcelas del mismo cultivo o de otros cultivos, lo que facilita un análisis interparcelario. Asimismo es posible analizar espacialmente la distribución de valores del K_c dentro de la parcela mediante un histograma para describir la homogeneidad espacial del cultivo y detectar así anomalías en el crecimiento, lo que hace posible el análisis intraparculario, acercándonos al concepto de agricultura de precisión.

La aplicación de la metodología K_c -NDVI a un extenso conjunto de parcelas de los cultivos en regadío en la zona de estudio en los años 2002 y 2003 ha permitido obtener las curvas típicas de evolución temporal de los coeficientes de cultivos K_c -NDVI durante dos campañas consecutivas. Las curvas correspondientes a un mismo cultivo muestran un muy similar comportamiento en ambas campañas, lo que podría considerarse un indicador de consistencia y reproducibilidad de los resultados. Las curvas K_c -NDVI reflejan las condiciones actuales de crecimiento de los cultivos, lo que se ha puesto de manifiesto en la campaña 2003 al reflejar un adelanto en el crecimiento de los cultivos de maíz y remolacha respecto a la campaña anterior consecuencia de un evento excepcional como fue la ola de calor que tuvo lugar en el mes de junio de 2003.

La comparación de los valores de K_c obtenidos mediante procedimientos tradicionales de visita en campo con aquellos obtenidos desde las imágenes de satélite mediante la aplicación de la metodología descrita expresada en la ecuación 13, muestra que la evolución temporal de las curvas desde ambos procedimientos siguen un mismo ritmo en los cultivos analizados, lo que muestra la capacidad de describir las fases de desarrollo mediante una secuencia de imágenes.

En cuanto a los valores numéricos, se ha encontrado un alto grado de coincidencia con los de aquellos cultivos que en su fase

de cobertura efectiva completa, cubren completamente el suelo. En aquellos otros cultivos en los que en la fase de máximo desarrollo no se cubre completamente el suelo, la ec. 13 infraestima ligeramente el valor de K_c . Es posible que la alta presencia de suelo desnudo induzca efectos de micro-advención que se reflejan en los valores usualmente aceptados y que no son considerados aplicando la ec. 13. En este caso, así como en otros en que la combinación de frecuencia de riegos y alta fracción de suelo desnudo sea un parámetro relevante es posible realizar un ajuste específico del parámetro β , ya que en él se refleja el papel del suelo. En este caso sería necesario considerar ecuaciones específicas para un cultivo e incluso para un determinado manejo de parcela. Más trabajos de investigación son necesarios en esta dirección.

Agradecimientos

DEMETER (DEMONstration of Earth observation TEchnologies in Routine irrigation advisory services), es un proyecto co-financiado por la Comisión Europea dentro del V Programa Marco (Programa "Energía, Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible", contrato EVG1-CT-2002-00078, 12/2002-11/2005). Asimismo hemos de agradecer los comentarios realizados en la revisión del trabajo por parte del comité técnico del congreso.

Bibliografía

- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M, 1998. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. *UN-FAO, Rome, Italy*.
- Bailey JO, 1990. The Potential Value of Remotely Sensed Data in the Assessment of Evapotranspiration and Evaporation. *Remote Sensing Reviews*, 4(2): 349-377.
- Bausch WC, 1993. Soil Background Effects on Reflectance-Based Crop Coefficients for Corn. *Remote Sensing of Environment*, 46: 213-222.
- Bausch WC, 1995. Remote sensing of crop coefficients for improving the irrigation scheduling of corn. *Agricultural Water Management*. 27: 55-68.
- Bausch WC, Neale CMU, 1989. Spectral inputs improve corn crop coefficients and irrigation scheduling. *Transactions of the ASAE*, 32(6): 1901-1908.
- Calera A, 2000. Seguimiento mediante Teledetección de la cubierta vegetal de los cultivos de secano y su relación con variables climáticas en Castilla la Mancha. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Calera A, Martínez C, Meliá J, 2001. A procedure for Obtaining Green Plant Cover: Relation to NDVI in a Case of Study for Barley. *International Journal of Remote Sensing*, 22 (17): 3357-3362.
- Carlson TN, Ripley D, 1997. On the Relation between NDVI, Fractional Vegetation Cover, and Leaf Area Index. *Remote Sensing of Environment*, 62: 241-252.
- Choudhury BJ, Ahmed NU, Idso SB, Reginato RJ, Daughtry CST, 1994. Relations Between Evaporation Coefficients and Vegetation Indices Studied by Model simulations. *Remote Sensing of Environment*, 50: 1-17.
- DEMETER, 2002. *Demonstration of Earth observation Technologies in Routine irrigation advisory services*, <http://www.demeter-ec.net>
- González-Piqueras J, Calera A, Gilabert MA, 2003. Estimation of Crop Coefficients by Means of Optimized Vegetation Indices for Corn, *Proceedings of the SPIE, Barcelona, September, 8-11th* (in press).
- Heilman JL, Heilman WE, Moore DG, 1982. Evaluating the Crop Coefficient Using Spectral Reflectance. *Agronomy Journal*, 74: 967-971.

- Jackson RD, Salomonson VV, Schmugge TJ, 1980. Irrigation management future techniques. pp. 197-212. In Proc. of the ASAE's Second National Irrigation Symp., Irrigation Challenges of the 80's. ASAE Publ. 6-81, Am. Soc. Agric. Engr., St. Joseph, MI.
- Jochum AM, Calera A, Cuesta A, 2003. Space-assisted irrigation management: towards user-friendly products. *Proceedings of ICID-CIID International Workshop: Use of remote sensing of crop evapotranspiration for large regions: September 17, Montpellier, FRANCE.*
- Martín de Santa Olalla F, Calera A, Domínguez A, 2003. Monitoring irrigation water use by combining Irrigation Advisory Service, and remotely sensed data with a geographic information system. *Agricultural Water Management* 61 (2003) 111-124.
- Martínez Beltrán C, Calera Belmonte A, Meliá Miralles J, Jochum AM, 2004. Uncertainty geometric correction effects in the NDVI cross-calibration from different satellites. *Remote Sensing of Environment*. Submitted.
- Neale CMU, Bausch WC, Heermann DF, 1989. Development of Reflectance-Based Crop Coefficients for Corn. *Trans. ASAE* 32(6): 1891-1899.
- Wright JL, 1982. New Evapotranspiration Crop Coefficients, *Journal of Irrigation and Drainage*, 108(1): 57-74.
- (Aceptado para publicación el 29 de abril de 2005)

Evolución de algunos parámetros morfológicos de la acelga recolectada hoja a hoja

P. Hoyos*, V. Álvarez**, A. Rodríguez**

* Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid. E.U.I.T. Agrícola. Ciudad Universitaria.28040 Madrid. E-mail: phoyos@agricolas.upm.es.

**Ingenieras Técnicas Agrícolas.

Resumen

En Villa del Prado (Madrid), la recolección de acelga es manual y escalonada, cortando las hojas exteriores, lo que favorece el desarrollo de hojas nuevas, consumiéndose así las hojas más tiernas. Éstas se comercializan en manojos de un kilo. Las hojas deben recogerse cuando tienen un tamaño adecuado para formar los manojos, sin esperar a que alcancen su máximo desarrollo. El objetivo de este ensayo es estudiar la evolución de los parámetros morfológicos y de calidad de las hojas de la selección del cv. Amarilla de Lyon realizada por Ramiro Arnedo, medidos en cada una de las recolecciones realizadas a lo largo del período productivo. También se estudian las correlaciones entre parámetros, ya que en situaciones en que se necesite disponer de datos de un parámetro de difícil o más costosa medida, se puede estimar a partir de otro que sea más rápido o fácil de medir. Los parámetros estudiados son longitud de la hoja, anchura y longitud del limbo, anchura de la penca, peso de las hojas, contenido de materia seca y área foliar. Para todos los parámetros estudiados, excepto el contenido en materia seca, los valores más bajos se registraron en enero, obteniéndose los valores más altos hacia el final del período productivo. La longitud es el parámetro morfológico que más ha variado, las hojas de las acelgas fueron más cortas durante los meses más fríos y más largas en los meses de primavera. El peso ha sufrido grandes variaciones, fluctuando entre los 24,39 g de enero, y los 56,38 g de mayo. En cuanto al área foliar, la mejor estimación de este parámetro se obtiene con el producto de la longitud por la anchura.

Palabras clave: *Beta vulgaris* var. *cicla*, peso, área foliar, materia seca, invernadero

Summary

The evolution of morphological parameters of swiss chard harvested leaf by leaf

In Villa del Prado (Madrid), chard harvest is manual and staggered, removing the outer leaves, allowing the inner ones to grow, so most tender leaves are harvested. Chard is prepared for market by bunching the leaves. Leaves must be harvested when their size is suitable for bunches, it is not necessary to wait until they are completely developed. In this study, the objective is to assess quality and morphological parameters evolution of leaves from cv. Amarilla de Lyon sel. Ramiro Arnedo, measured in each of the harvests made during the growing cycle. Parameters relations have also been studied, because when data are needed from a parameter which is difficult to measure, information can be obtained from an easier one. Studied parameters are: leaf length, limb length and width, leaf stalk width, leaf weight, dry matter and leaf area. Lower values were obtained in January, while higher values at the end of the growing cycle, except for dry matter. Length is the morphological parameter that has changed the most; chard leaves were shorter during colder days and longer during spring months. Weight varied greatly, fluctuating between 24.39 g in January to 56.38 g in May. Best estimate of leaf area was obtained by multiplying length and width.

Key words: *Beta vulgaris* var. *cicla*, weight, leaf area, dry matter, greenhouse

Introducción

La utilización de la acelga desde el punto de vista culinario es similar en las diferentes zonas de cultivo, ya que se basa fundamentalmente en la cocción de las hojas. Sin embargo, hay algunas diferencias en cuanto a las partes preferidas de las hojas, así como el estado fenológico en que se efectúa la recolección. Cuando se pretende utilizar íntegramente la hoja, ésta se recoge con un tamaño medio o pequeño, aprovechándose tanto el pecíolo o penca como el limbo; mientras que si se pretende consumir principalmente la penca, la recolección se realiza sobre hojas plenamente desarrolladas (Sobrino, 1994).

Uno de los aspectos que condiciona la recolección es el desarrollo de la planta de acuerdo con el fin a que se destina. Si se quiere aprovechar la hoja entera, en cultivo de invierno en invernadero, se puede empezar la recolección sobre 60 días después del trasplante, pero si se desean pencas muy desarrolladas hay que esperar bastante más, hasta que la hoja alcance su máximo desarrollo, tiempo que en condiciones extremas podría estar en el entorno de 125-130 días.

La recolección de la acelga se puede realizar de dos formas: recolectando las plantas enteras cuando hayan alcanzado un tamaño comercial (entre 0,75 y 1 kg), o bien cortando las hojas según van creciendo. Tradicionalmente se recolectaba planta entera para ventas de mercado, mientras que la recolección por hojas era una práctica del huerto familiar. Actualmente, la recolección hoja a hoja está cada vez más extendida, a pesar de la necesidad de más mano de obra, debido a las ventajas en cuanto al rendimiento del cultivo y a la posibilidad de escalonar la producción, sacando al mercado la cosecha de forma continuada, evitando las bajadas de precios que se producen cuando toda la producción llega al mercado a la

vez. En invernadero conviene hacer la recolección por hojas, para alcanzar la máxima producción, obteniéndose de esta manera un rendimiento 2-3 veces mayor que recolectando la planta entera de una vez.

En Villa del Prado, lugar en el que se ha llevado a cabo el ensayo, la recolección es manual y escalonada, cortando las hojas exteriores, que son las más desarrolladas, lo que favorece el desarrollo de hoja nuevas, que se cortarán más tarde, consumiéndose así las hojas más tiernas (Pérez, 2001). Las hojas recolectadas una a una se colocan en manojos de un kilo sujetos con una goma o una cinta, que a su vez se empaquetan en conjuntos de 10 kg en cajas de madera o plástico.

Dentro de los cultivares de acelga podemos establecer dos grupos claramente diferenciados, atendiendo al tipo de hoja y a su forma de aprovechamiento (Sobrino, 1994). El primero lo forman cultivares de penca ancha o semiancha, y el segundo cultivares de penca estrecha; a su vez, dentro de cada grupo pueden ser de limbo verde o amarillo. Los cultivares de penca ancha son actualmente la mayoría de los cultivados, por ser los de mayor aceptación; en estos cultivares se ha mejorado principalmente el pecíolo o penca, que llega a alcanzar grandes dimensiones, especialmente en anchura.

En nuestro país, los cultivares que más se utilizan son de penca ancha y no muy larga, por ser esta parte de la hoja la que generalmente se aprecia más. En el caso de que se pretenda aprovechar la totalidad de la hoja, limbo y pecíolo, interesa sembrar un cultivar que no tenga el pecíolo muy ancho y haya cierto equilibrio entre el crecimiento de éste y el limbo, aunque para este tipo de utilización también es importante no esperar al máximo tamaño, se debe anticipar la cosecha lo necesario para evitar un crecimiento excesivo de la penca, y así las hojas recolectadas serán más tiernas y tendrán más calidad como verdura.

El cultivar más empleado en esta zona de Madrid es Amarilla de Lyon, ya que el mercado madrileño demanda cultivares de penca blanca y color del limbo verde claro. La variedad Amarilla de Lyon posee un limbo amarillento, que cubre algo la penca y ésta se introduce en medio del limbo para terminar estrechándose; la superficie del limbo es de rugosidad media y la penca muy ancha, de color muy blanco; destacan también las dimensiones del limbo, especialmente en anchura. Hay varias selecciones de este cultivar, realizadas por diferentes empresas de semillas.

La acelga que se cultiva en Villa del Prado, Amarilla de Lyon, está destinada a consumo en fresco, comercializándose las hojas enteras, ya que se consumen principalmente de esa forma. Así, la recolección se realiza hoja a hoja, en lugar de cosechar las plantas enteras, ya que de esta manera se consiguen mayores rendimientos. Por todo esto, las hojas deben cosecharse cuando tienen un tamaño adecuado para formar los manojos, sin esperar a que alcancen su máximo desarrollo, ya que entonces serían demasiado viejas para consumirlas enteras; de esta manera se cosechan hojas tiernas, con un tamaño medio y con un buen equilibrio entre el limbo y la penca.

El objetivo de este ensayo es estudiar la evolución de los parámetros morfológicos y de calidad de las hojas de una de las selecciones del cv. Amarilla de Lyon, la realizada por la empresa Ramiro Arnedo, medidos en cada una de las recolecciones realizadas a lo largo del período productivo. Por otro lado, también se estudia la relación entre parámetros, ya que en situaciones en que se necesite disponer de datos de un parámetro de difícil o más costosa medida, se puede estimar a partir de otro que sea más rápido o fácil de medir. Se hace distinción entre parámetros morfológicos y de calidad ya que, aunque los parámetros morfológicos puedan dar una

idea de la calidad de la hoja de acelga también se miden otros parámetros que no son morfológicos, como peso y contenido de materia seca. Los parámetros morfológicos estudiados son longitud de la hoja, anchura y longitud del limbo y anchura de la penca.

Por otro lado se estudia también el área foliar y su relación con la longitud y el ancho del limbo. El área foliar es un parámetro ampliamente usado en estudios de ecofisiología de cultivos, que también puede interesar desde el punto de vista comercial, y que en algún momento podría ofrecerse también como atributo de calidad. Para su determinación se utilizan diferentes métodos, tanto indirectos como directos, que pueden implicar en algunos casos la destrucción de la hoja. Entre los indirectos destacan los que utilizan correlaciones alométricas entre magnitudes de las hojas y el área foliar. Los métodos directos son los que utilizan medidores de área foliar, que tienen una resolución del orden de mm^2 . (Astegiano *et al.*, 2001). La medición directa, aunque resulta más precisa, requiere de equipos de alto costo y que en ocasiones no son fáciles de utilizar, principalmente con hojas de gran tamaño y profundamente lobuladas, cuya medida con los aparatos actuales es aún mucho más lenta al tener que trocear las hojas para conseguir medirlas en su totalidad. Esto, en parte, explica la amplia difusión de los métodos de estimación derivados de medidas lineales de las hojas. La estimación del área foliar basada en características alométricas de la hoja permite superar la dificultad operativa que presenta su determinación en hojas grandes como las de acelga. En este trabajo se analiza la correlación del área del limbo con el largo y el ancho máximo de éste, con el objeto de obtener ecuaciones de regresión que permitieran una adecuada estimación del área foliar. También se analiza la relación del área foliar con el producto de los dos parámetros indi-

cados anteriormente que, en definitiva, puede ser una mejor aproximación al estar considerando dos dimensiones.

Material y métodos

El ensayo tuvo lugar en un invernadero comercial de Villa del Prado (Madrid) de estructura de acero con cubierta de polietileno de 800 galgas (200 micras).

El cultivar utilizado en el ensayo fue la selección que, dentro del cultivar Amarilla de Lyon, ha realizado la empresa de semillas Ramiro Arnedo. Es un cultivar de hojas anchas y abullonadas de color verde medio oscuro y penca gruesa, carnosa y muy blanca; vigoroso, de rápido desarrollo y resistente a la subida a flor, siendo su época propia de cultivo invierno-primavera.

Se utilizó planta procedente de un semillero comercial, realizándose la siembra un mes antes de la plantación. La plantación tuvo lugar el 20 de octubre de 2001, en mesetas de 60 cm de anchura separadas por surcos de 30 cm. Sobre la meseta se situaron 3 líneas, siendo la distancia entre la central y las dos laterales de 20 cm. Dentro de cada línea las plantas se separaron de 17 a 18 cm, obteniendo una densidad en el entorno de 19 plantas·m⁻².

Las plantas objeto del estudio se tomaron de tres parcelas que tenía 3 m de largo y 0,9 m de ancho, contando con aproximadamente 50 plantas en los 2,7 m² de superficie.

El ensayo tuvo lugar en un invernadero comercial, por lo que las recolecciones se realizaban según marcaba el agricultor propietario del invernadero, de manera que la cadencia dependía del desarrollo de la planta, del mercado y de la disponibilidad de mano de obra. La primera recolección tuvo lugar 58 días después de la plantación (el 17

de diciembre de 2001), realizándose un total de siete recolecciones, con una cadencia de 25-35 días en los meses de invierno, y 11-25 días en los meses de primavera. La recolección fue manual, cortando las hojas basales más exteriores, tomando la longitud de la hoja como indicador visual del momento de la cosecha.

Parámetros morfológicos y de calidad

En cada una de las recolecciones se tomaba al azar de cada parcela una muestra de cinco hojas que se llevaban al laboratorio para ser analizadas morfológicamente, se pesaban, y se metían en la estufa para determinar su contenido en materia seca.

Los parámetros de calidad controlados fueron: longitud de la hoja, medida desde el extremo del pecíolo al extremo del limbo, expresada en cm; longitud del limbo, medida desde donde las alas del limbo tenían 1 cm de ancho a cada lado de la penca hasta el extremo superior del limbo, expresada en cm; anchura del limbo, medida en la zona más ancha, expresada en cm; anchura de la penca, tomada a unos dos centímetros del extremo del pecíolo por donde se había separado la hoja de la planta, expresada en mm; peso de la hoja entera, expresado en gramos; y materia seca, determinada tras tener las hojas en una estufa a 80 °C durante 48 horas hasta alcanzar un peso constante, expresada en porcentaje de peso seco respecto a peso fresco, de la hoja entera.

Área foliar

La medición del área foliar se hizo en las 15 hojas seleccionadas al azar de las parcelas de estudio, en la 2ª recolección. Se cortaron las hojas a la altura en que las alas del limbo miden 1 cm, midiéndose por separado el área del limbo y el área de la penca con un analizador digital de imágenes (At-Delta-T),

expresándolas en cm^2 . El área foliar total de la hoja de acelga se obtiene sumando el área de la penca y el área del limbo.

Para relacionar el área foliar con el largo y el ancho máximo del limbo, se tomaron esas medidas y, junto con los datos del área foliar se hizo la representación gráfica y se obtuvieron las rectas de regresión. Se hizo lo mismo para la relación del producto de la longitud por la anchura con su área.

Resultados y discusión

Evolución de los parámetros morfológicos y de calidad estudiados

La longitud de la hoja ha fluctuado entre los 42 y los 53 cm, exceptuando el mes de enero, en el que se registró el valor más bajo, debido a las bajas temperaturas (figura 1a). La variabilidad de este parámetro ha sido muy parecida en todas las recolecciones, menos en la última, que fue bastante alta (figura 1a). La longitud media obtenida es de 46 cm. En cuanto a su velocidad de crecimiento (figura 2a), va aumentando hasta alcanzar en marzo un crecimiento de 2,75 cm diarios; entre la 4ª y la 5ª recolección se produce una bajada en la velocidad de crecimiento, para volver a subir y alcanzar su valor máximo de 4,82 cm diarios.

La longitud del limbo tuvo el valor más bajo en el mes de febrero, aumentando a partir de ese momento hasta alcanzar su valor más alto en la última recolección (figura 1c). La variabilidad de este parámetro fue similar en todas las recolecciones, excepto en la 2ª y la 6ª, en la que fue bastante alta (figura 1c). La media obtenida para la longitud del limbo ha sido de 29,3 cm. La velocidad de crecimiento tuvo una evolución parecida a la de la longitud de la hoja (figura 2c), durante los meses de invierno permanece más o menos constante,

produciéndose un fuerte aumento del crecimiento diario en primavera; el valor más alto se corresponde con el mes de abril, aumentando la longitud del limbo en ese mes una media de 3 mm al día (figura 2c).

La anchura del limbo ha estado entre los 20 y 25 cm, registrándose el valor más bajo en el mes de enero, y el más alto en el mes de marzo (figura 1b). La variabilidad de este parámetro fue más alta en la 1ª y 6ª recolecciones (figura 1b). El valor medio obtenido para este parámetro ha sido de 21,97 cm. En cuanto a su velocidad de crecimiento (figura 2b), entre la 3ª y 4ª recolección, desde finales de febrero a mediados de marzo, se produce un salto en el valor de la velocidad de crecimiento hasta alcanzar 1,58 cm diarios, alcanzando el valor más alto (2 cm diarios) a mediados del mes de abril.

Mediante el cociente longitud / anchura del limbo se pretende obtener una idea de la forma del limbo de la hoja. Este cociente ha variado bastante, obteniéndose un valor de 1,12 en el mes de marzo, llegando hasta 1.6 en el mes de mayo. Durante los meses de enero, febrero y marzo las hojas tuvieron una longitud algo mayor que su anchura (unos 3 cm más), mientras que en diciembre, abril y mayo la diferencia entre longitud y anchura fue bastante mayor, alrededor de 10 cm.

La anchura de la penca va aumentando hasta la 4ª recolección, produciéndose entonces una parada para luego disminuir en las dos últimas recolecciones (figura 1d). La anchura de la penca ha variado entre los 24 y 34 mm. La variabilidad ha sido bastante alta en todas las recolecciones, destacando la 1ª y la 6ª (figura 1d). La media obtenida para este parámetro ha sido 29,59 mm. Su velocidad de crecimiento ha ido en aumento desde la primera recolección, produciéndose dos picos importantes en la 4ª y 6ª recolecciones

(figura 2d); el valor más alto (2,5 mm por día) se alcanza a mediados de abril (figura 2d).

El peso de la hoja es el parámetro que más ha variado, desde los 24,4 g del mes de enero, a los 59,5 g del mes de abril (figura 1e). Esta variación de peso ha influido a la hora de sacar los manojos al mercado, ya que en aquellos períodos en los que el peso fue más bajo, los manojos eran de hojas más pequeñas y con un mayor número de hojas, coincidiendo, además, con que el precio de la acelga en el mercado era el más alto. El peso medio obtenido para las hojas cosechadas fue 39,86 g. En cuanto al aumento de peso registrado en la hoja a lo largo del cultivo, al principio aumenta hasta los 2,45 g diarios, descendiendo entre la 4ª y 5ª recolección a los 2,38 g, aumentando de nuevo hasta alcanzar su valor máximo, 4,76 g por día en la 6ª recolección, a mediados del mes de abril (figura 2e).

Los valores obtenidos para el porcentaje de materia seca han estado entre 4,5 y 6 % (figura 1f), el valor más alto se ha registrado en el mes de enero (5,88 %), y el más bajo en el mes de mayo (4,43 %). El contenido de materia seca tuvo sus valores más altos en los meses más fríos, coincidiendo con el menor crecimiento de las hojas, mientras que en los meses de mayor crecimiento, el contenido de materia seca de las hojas fue menor (figura 1f). El valor medio obtenido para este parámetro ha sido 4,96 %. En cuanto a la variación de la producción de materia seca, prácticamente ha ido en aumento durante todo el ciclo (figura 2f), obteniéndose en mayo un máximo de 0,95 g por planta al día.

Relación entre parámetros

En este apartado se han relacionado una serie de parámetros tanto morfológicos como de calidad de la hoja, para hallar la

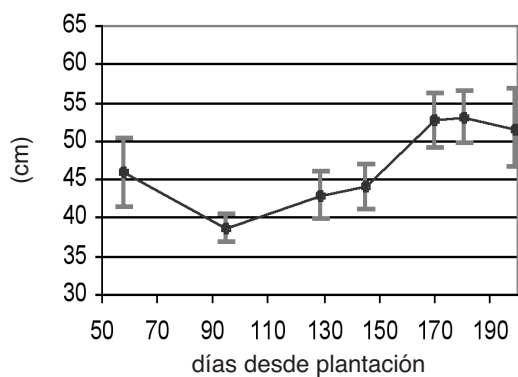
correlación entre ellos, y en aquellos que haya una buena correlación encontrar la ecuación que permita calcular un parámetro a partir de otro que sea más fácil de medir en campo, o que sea más rápido de obtener. Pudiendo así estimar de una forma fiable datos en campo, tales como la producción a partir de una medida lineal de la hoja como es la anchura o la longitud.

Para la relación entre la longitud de la hoja y la anchura del limbo se ha obtenido un coeficiente de correlación de $r = 0,3438$ (figura 3a), que es significativo para un nivel de 0,001. Por cada centímetro que crezca la hoja en longitud, crecerá 0,157 cm en anchura.

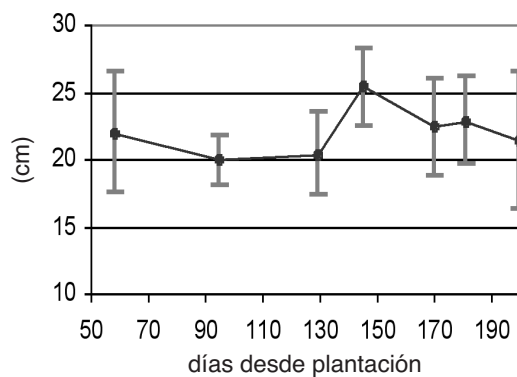
El coeficiente de correlación entre la anchura y longitud del limbo es $r = 0,3863$ (figura 3b), que es también significativo para un nivel de 0,001. Según se observa en la ecuación de la recta, por cada centímetro en anchura que crezca la hoja, el limbo crecerá 0,706 cm.

Para la relación entre la longitud de la hoja y la longitud del limbo, el coeficiente de correlación obtenido es $r = 0,8173$ (figura 3c), significativo para un nivel de 0,001, es la más alta de todas las correlaciones. Por cada centímetro que crece en longitud la hoja, el limbo crece 0,682 cm.

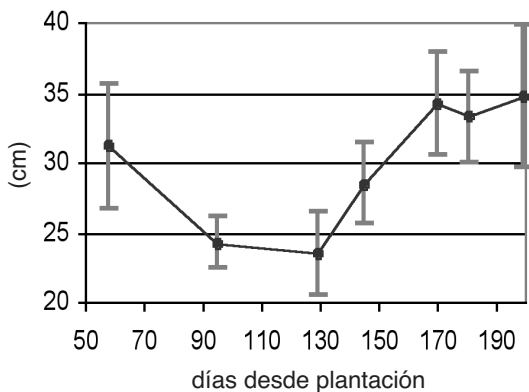
El coeficiente de correlación obtenido para la relación entre la longitud y el peso de la hoja ha sido también alto, $r = 0,7264$ (figura 3d), siendo significativo para un nivel de 0,001. Mediante la ecuación obtenida se podría ir al campo, tomar la medida de la longitud de la hoja y estimar la producción, contando en cada caso con el número de hojas recolectadas, parámetro estudiado en Hoyos et al. (2004). En estados cercanos a la recolección, por cada cm de aumento de la longitud de la hoja, ésta pesaría 1.854 g más. Si se quisieran recoger hojas de unos 50 g de peso, éstas deberían medir unos 46 cm de largo.



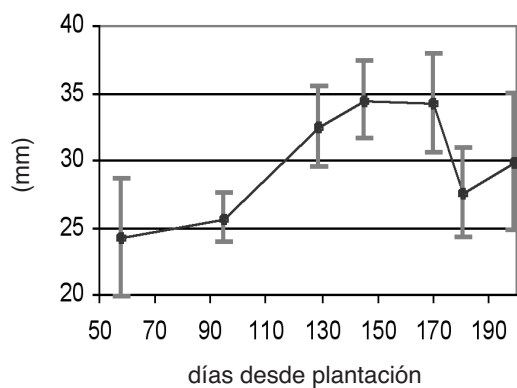
a. Longitud de la hoja.



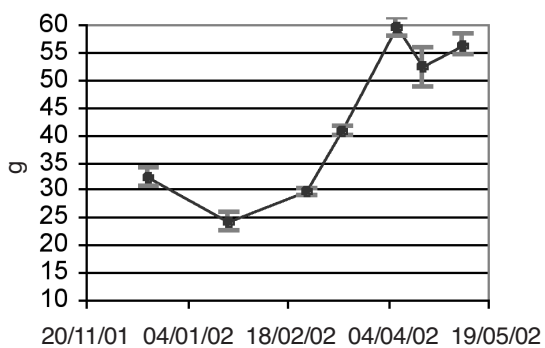
b. Anchura del limbo.



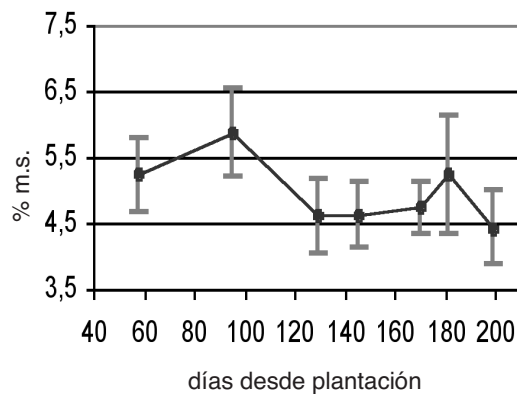
c. Longitud del limbo.



d. Ancho de la penca.



e. Peso medio de la hoja.



f. Materia seca.

Figura 1. Evolución de los parámetros a lo largo del cultivo, en acelga cv. Amarilla de Lyon selección Ramiro Arnedo. Barras verticales, representan el error estándar.

Figure 1. Evolution of the parameters during the growing cycle on chard cv. Amarilla de Lyon, sel. Ramiro Arnedo. Vertical bar represent +/- standard error.

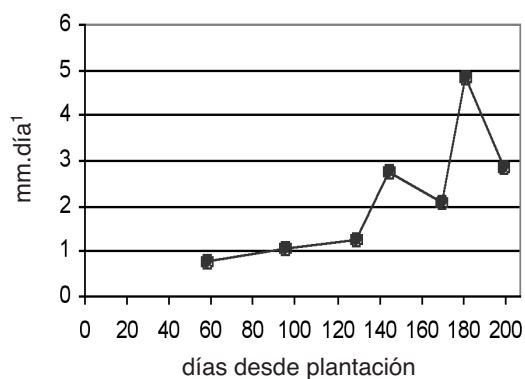
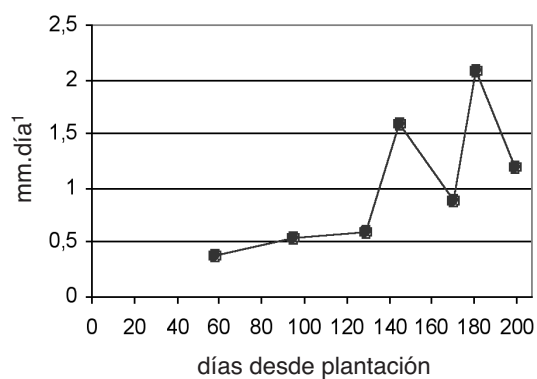
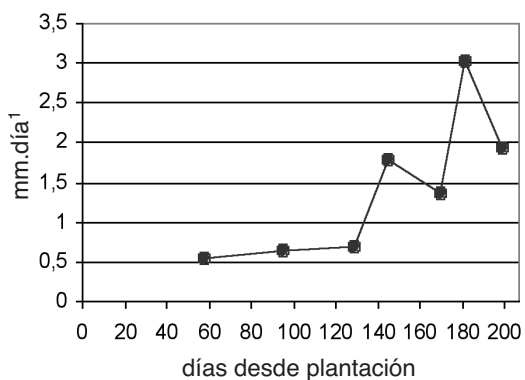
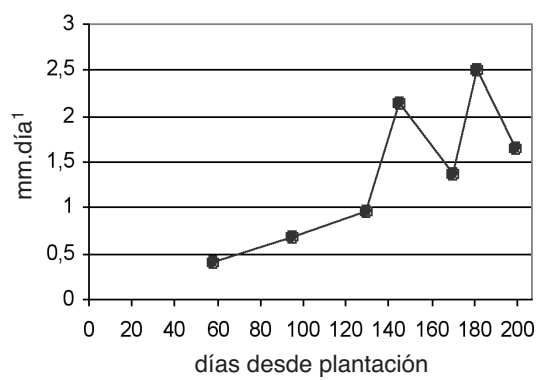
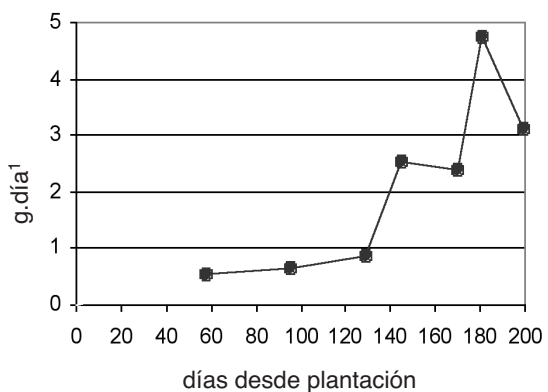
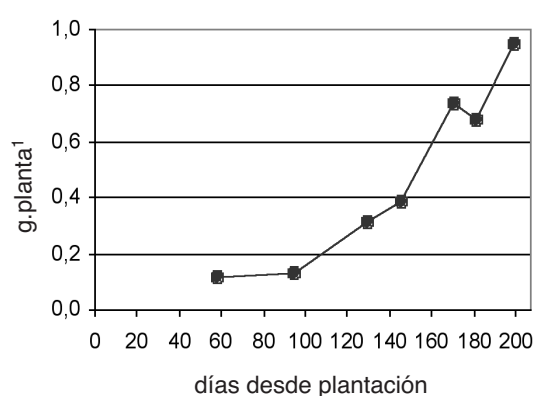
**a. Longitud de la hoja.****b. Anchura del limbo.****c. Longitud del limbo.****d. Ancho de la penca.****e. Peso de la hoja.****f. Contenido de materia seca.**

Figura 2. Crecimiento diario de los diferentes parámetros medidos en hojas de acelga cv. Amarilla de Lyon, selección Ramiro Arnedo.

Figure 2. Daily growing of studied parameters on chard leaf cv. Amarilla de Lyon., sel. Ramiro Arnedo.

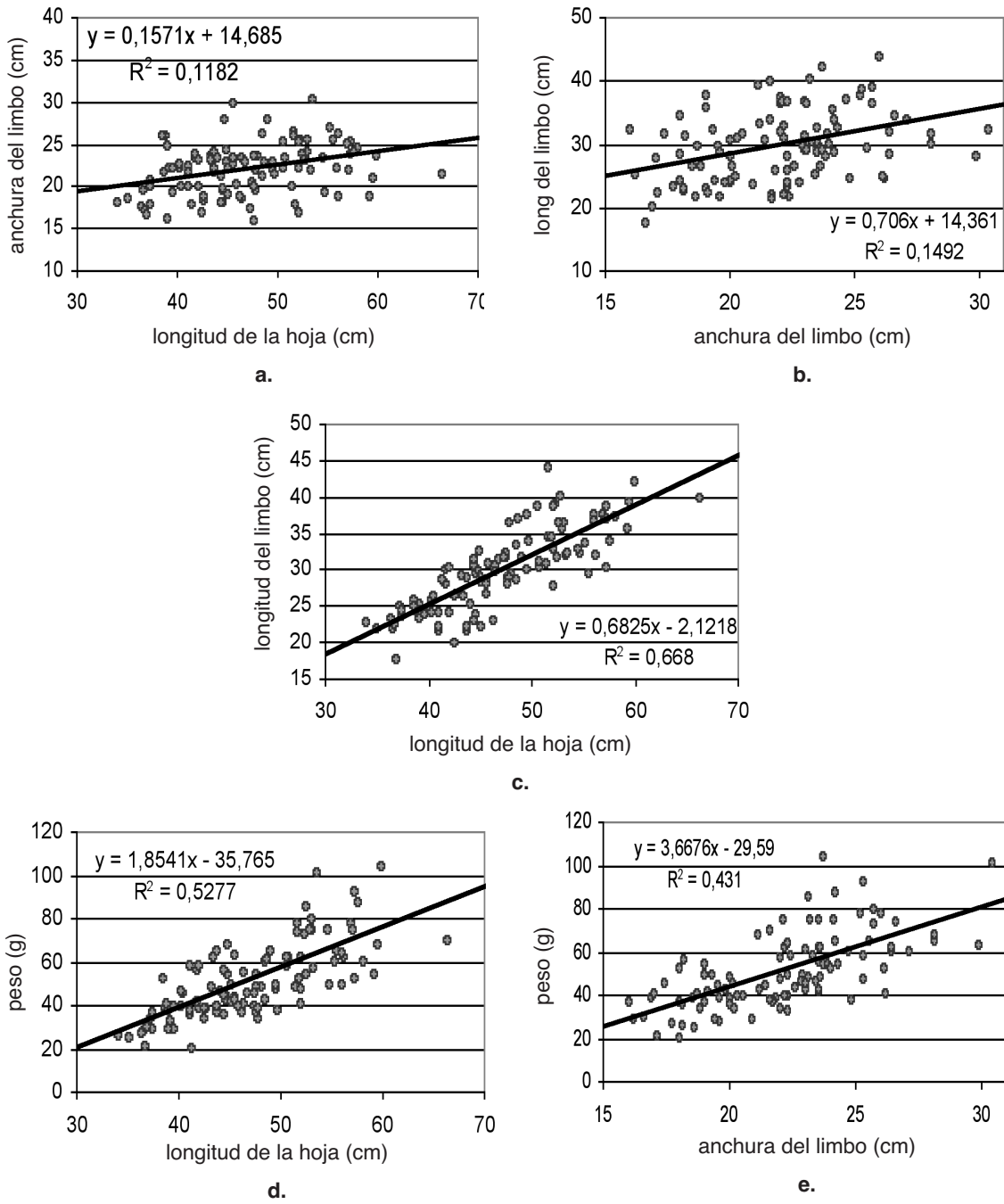


Figura 3. Relaciones obtenidas entre los parámetros medidos en hoja de acelga cv. Amarilla de Lyon, sel. Ramiro Arnedo.

Figure 3. Studied parameters relations on chard leaf cv. Amarilla de Lyon., sel. Ramiro Arnedo.

La relación entre la anchura y el peso de la hoja, junto con la relación entre longitud y peso, pueden ser de bastante utilidad práctica, ya que con una medida tan fácil como es tomar el ancho o la longitud de la hoja en el campo, se podría calcular la producción de una forma bastante aproximada, siempre y cuando se contara con el número de hojas recolectadas. Se ha obtenido un coeficiente de correlación $r = 0,6565$ (figura 3e), que es significativo para un nivel de 0,001. Con la ecuación obtenida se podría calcular el peso a partir de una medida lineal como es la anchura. Por otro lado, si se quisieran recoger hojas de unos 42 g de peso, se tendrían que recoger hojas de unos 19,5 cm de ancho. Por cada centímetro que crezca la hoja en anchura, aumentará su peso en 3,667 g.

Área foliar

El área foliar total de las hojas analizadas ha estado entre los 286 y los 469 cm², siendo la

media 372,2 cm². El área del limbo ha variado entre los 249 y los 436 cm², y el área de la penca entre 23 y 46 cm². El valor medio del área del limbo ha sido 340 cm², y el del área de la penca, 32,2 cm².

Para la relación entre la longitud y el área del limbo el coeficiente de correlación ha sido $r = 0,761$, que es significativo para un nivel de 0,001. En la figura 4 se puede observar como por cada centímetro que crezca el limbo a lo largo, el área aumentará 24,946 cm².

El coeficiente de correlación para la relación entre la anchura y el área del limbo ha sido más alto que para la relación anterior, $r = 0,892$ (figura 5), siendo significativo para un nivel de 0,001. Por cada centímetro en anchura que creciera el limbo el área aumentaría 25,215 cm².

La relación entre el producto de la longitud por la anchura y el área del limbo es mucho mejor que las anteriores, se ha obtenido el

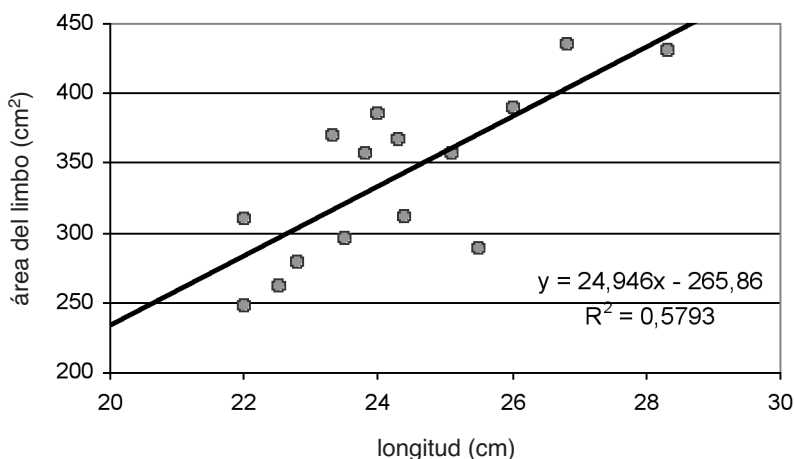


Figura 4. Relación entre la longitud y el área del limbo en acelga cv. Amarilla de Lyon, sel. Ramiro Arnedo.

Figure 4. Relation between length and limb area on chard cv. Amarilla de Lyon, sel. Ramiro Arnedo.

coeficiente de correlación más alto, $r = 0,967$, significativo incluso para un nivel de $0,001$ (figura 6). Con dos medidas tan fáciles de obtener en el campo, como son la longitud y la anchura del limbo, se podría obtener el área sin necesidad de trasladar las muestras al laboratorio y emplear el anali-

zador digital de imágenes, equipo que no es muy habitual en los laboratorios que no sean de investigación, y evitándose una gran cantidad de trabajo pues, como se dijo, en hojas de acelga éste se multiplica al tener que trocearlas para medirlas, ya que son demasiado grandes.

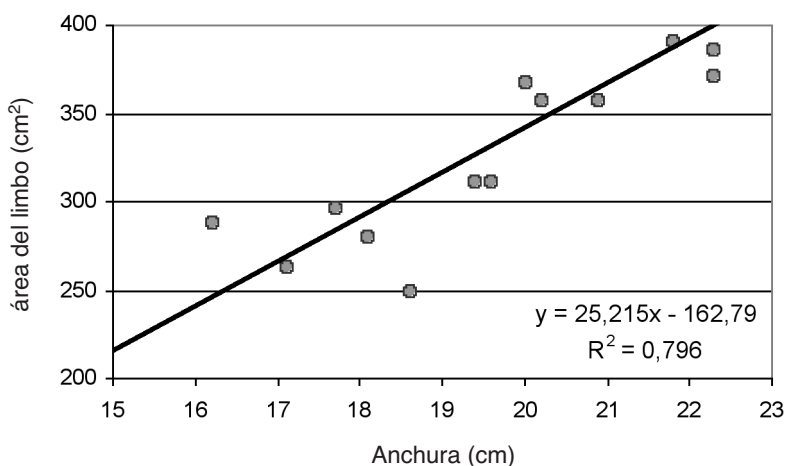


Figura 5. Relación entre anchura y área del limbo en acelga cv. Amarilla de Lyon sel. Ramiro Arnedo.
 Figure 5. Relation between width and limb area on chard cv. Amarilla de Lyon, sel. Ramiro Arnedo.

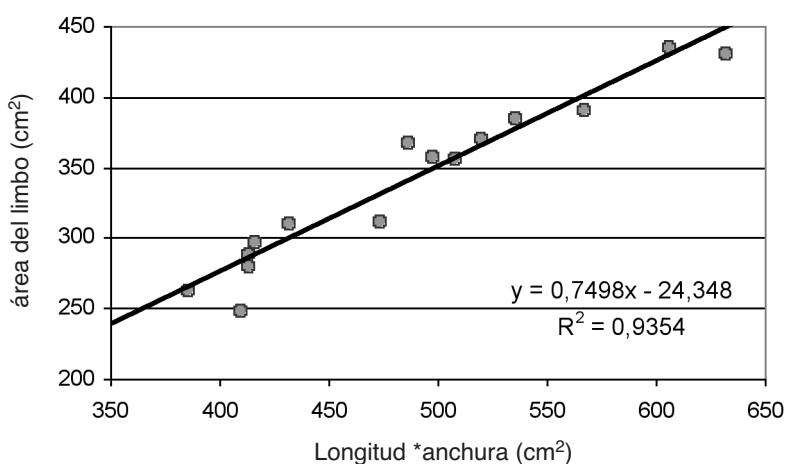


Figura 6. Relación entre las superficies foliar medida y calculada (longitud x anchura de limbo) en acelga cv. Amarilla de Lyon sel. Ramiro Arnedo.
 Figure 6. Relation between limb area measured and calculated (length x width) on chard cv. Amarilla de Lyon, sel. Ramiro Arnedo.

Bibliografía

- Astegiano ED, Favaro JC, Bouzo CA, 2001. Estimación del área foliar en distintos cultivares de tomate utilizando medidas foliares lineales. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* Vol. 16 (2): 249-256.
- Hoyos P, Álvarez V, Rodríguez A, 2004. Evaluación de la producción de acelga cv. Amarilla de Lyon recolectada hoja a hoja. Comparación con recolección de planta entera. *Revista Horticultura.* Junio 2004.
- Pérez F, 2001. Cultivo de la acelga en invernadero en Villa del Prado. *Boletín Agrario de la Consejería de Medio Ambiente Comunidad de Madrid* nº 30: 40-41.
- Sobrino E, 1994. *Hortalizas de hojas, de raíz y hongos.* Ed. Aedos. 313p.
- (Aceptado para publicación el 10 de junio de 2005)

**PREMIOS DE PRENSA AGRARIA 2005
DE LA
ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL
PARA EL DESARROLLO AGRARIO**

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

El día 9 de abril de 1987, la Junta Directiva de AIDA aceptando la propuesta del Jurado del Premio ITEA 1986 instituyó dos premios; uno para los artículos publicados en la sección de Producción Animal y otro para aquellos que aparezcan en la sección de Producción Vegetal.

Los premios se regirán de acuerdo a las siguientes

BASES

1. Podrán concursar todos los artículos que versen sobre cualquier tema técnico-económico-agrario.
2. Los artículos que podrán acceder a los premios serán todos aquellos que se publiquen en ITEA en el año 2005. Consecuentemente, los originales deberán ser enviados de acuerdo con las normas de ITEA y aprobados por su Comité de Redacción.
3. El jurado estará constituido por las siguientes personas:
 - a) Presidente de AIDA, que presidirá el jurado.
 - b) Director de la revista ITEA, que actuará de Secretario.
 - c) Director Gerente del CITA-Gobierno de Aragón.
 - d) Director del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.
 - e) Director de la Estación Experimental de Aula Dei.
4. Los premios serán anuales y con una dotación de 300 € cada uno.
5. Las deliberaciones del jurado serán secretas, y su fallo inapelable.
6. El fallo del jurado se dará a conocer en la revista ITEA, y la entrega del premio se realizará con motivo de la celebración de las Jornadas de Estudio de AIDA.



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

CIHEAM/IAMZ - Cursos 2004-05-06

CIHEAM

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
PRODUCCIÓN VEGETAL	*MEJORA GENÉTICA VEGETAL	4 Oct. 04/ 10 Jun. 05	Zaragoza	IAMZ
	GESTIÓN DE RIESGOS EN LA AGRICULTURA MEDITERRÁNEA: SEGUROS AGRARIOS	22-26 Nov. 04	Zaragoza	IAMZ/MAPA-ENESA/ OCDE/AECI
	USO DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN MEJORA VEGETAL	17-28 Ene. 05	Cabrils	IAMZ/IRTA
	*OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA	26 Sep. 05/ 31 Mayo 06	Córdoba	UCO/CAP-JA/ CSIC/CO/IAMZ
	DISEÑO Y ANÁLISIS DE SERIES DE ENSAYOS: MÉTODOS CLÁSICOS Y BASADOS EN QTLs	12-23 Sep. 05	Zaragoza	IAMZ/Generation Challenge Program
	AGRICULTURA DE REGADÍO SOSTENIBLE EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA: GESTIÓN DE INSUMOS Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN	14-25 Nov. 05	Zaragoza	IAMZ
	HORTICULTURA INTENSIVA Y MEDIO AMBIENTE	16-20 Ene. 06	Zaragoza	IAMZ
	CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD ESPACIAL Y TEMPORAL PARA LA PLANIFICACIÓN AGRARIA Y EL MANEJO DE CULTIVOS EN CONDICIONES MEDITERRÁNEAS	7-17 Mar. 06	Zaragoza	IAMZ/CARDA
	ALIMENTOS FUNCIONALES: BASES CIENTÍFICAS Y OPORTUNIDADES PARA EL SECTOR AGROALIMENTARIO	3-7 Abr. 06	Zaragoza	IAMZ
PRODUCCIÓN ANIMAL	PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO DE CAMPAÑAS DE SANEAMIENTO GANADERO	13-17 Sep. 04	Zaragoza	IAMZ/FAO/OIE
	TRAZABILIDAD DE PRODUCTOS CÁRNICOS: SISTEMAS Y TÉCNICAS	13-17 Dic. 04	Zaragoza	IAMZ
	VALORIZACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE OVINOS Y CAPRINOS EN EL ÁREA MEDITERRÁNEA. TECNOLOGÍAS ACTUALES Y PERSPECTIVAS DE MERCADO	7-18 Feb. 05	Pamplona	IAMZ/Univ. Pública de Navarra
	TÉCNICAS MOLECULARES EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL	4-8 Abr. 05	León	IAMZ/Univ. León
	PRODUCCIÓN ANIMAL Y GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	2-7 Mayo 05	Fonte Boa	IAMZ/EZN
	*PRODUCCIÓN ANIMAL	3 Oct. 05/9 Jun. 06	Zaragoza	IAMZ

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

- MEJORA GENÉTICA VEGETAL: 04-05; 06-07; 08-09
- OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA: 03-04; 05-06; 07-08
- PRODUCCIÓN ANIMAL: 03-04; 05-06; 07-08
- PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE: 04-05; 06-07; 08-09
- MARKETING AGROALIMENTARIO: 03-04; 05-06; 07-08
- ECONOMÍA Y GESTIÓN DE LA ACTIVIDAD PESQUERA: 04-05; 06-07; 08-09
- ACUICULTURA: 04-05; 06-07; 08-09

Se destinan primordialmente a titulados superiores en vías de especialización postuniversitaria. No obstante se estructuran en ciclos 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 los cursos de Mejora Genética Vegetal, Ordenación Rural en Función del Medio Ambiente y Acuicultura finaliza el 15 de Mayo 2002. El plazo de inscripción para los cursos de Mejora genética vegetal, Planificación integrada para el desarrollo rural y la gestión del medio ambiente, Economía y gestión de la actividad pesquera y Acuicultura finaliza el 15 de Mayo 2004. El plazo de inscripción para el curso de Olivicultura y elaiotecnica finaliza el 15 de Abril 2005. El plazo de inscripción para los cursos de Producción animal y Marketing agroalimentario finaliza el 15 de Mayo 2005.

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.

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
MEDIO AMBIENTE	PROGRAMAS DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL PARA EL CONTROL DE INCENDIOS FORESTALES EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA	27 Sep./1 Oct. 04	Zaragoza	IAMZ/MMA-DGB/FAO/AECI
	*PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	4 Oct. 04/ 10 Jun. 05	Zaragoza	IAMZ
	ECONOMÍA AMBIENTAL Y DE LOS RECURSOS NATURALES	24 Ene./4 Feb. 05	Zaragoza	IAMZ
	RESTAURACIÓN FORESTAL EN LA LUCHA CONTRA LA DESERTIFICACIÓN: INNOVACIONES, CONTROL DE CALIDAD Y EVALUACIÓN DE PROYECTOS	19-25 Sep. 05	Zaragoza	IAMZ/REACTION/CE-DGInvestigación
	NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA PLANIFICACIÓN INTEGRADA DE LOS RECURSOS HÍDRICOS EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA	12-16 Dic. 05	Zaragoza	IAMZ
	MITIGACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA SEQUÍA: MÉTODOS, TÉCNICAS Y ALTERNATIVAS DE GESTIÓN	12-16 Feb. 06	Aleppo	IAMZ/ICARDA/FAO
	DIAGNÓSTICO, SEGUIMIENTO Y GESTIÓN DE LA SALUD DE LOS BOSQUES	20-25 Feb. 06	Zaragoza	IAMZ
	BALANCE DE CARBONO EN SISTEMAS AGRARIOS Y FORESTALES: EL POTENCIAL DE REDUCCIÓN DE EMISIONES Y LOS COMPROMISOS DEL PROTOCOLO DE KIOTO	27-31 Mar. 06	Barcelona	IAMZ/CREAF
	LOS INDICADORES AMBIENTALES COMO HERRAMIENTA DE APOYO A LA GESTIÓN SOSTENIBLE DEL MEDIO RURAL	8-12 Mayo 06	Zaragoza	IAMZ
	SISTEMAS DE AYUDA A LA DECISIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA GESTIÓN MEDIOAMBIENTAL DE ZONAS RURALES	12-16 Jun. 06	Zaragoza	IAMZ
COMERCIALIZACIÓN	LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DEL COMERCIO Y SU IMPACTO EN EL COMERCIO INTERNACIONAL AGROALIMENTARIO	18-22 Oct. 04	Zaragoza	IAMZ/OMC
	ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN EL MARKETING AGROALIMENTARIO: NORMATIVAS, SISTEMAS Y REPERCUSIONES EMPRESARIALES	7-11 Mar. 05	Zaragoza	IAMZ
	TRAZABILIDAD Y ETIQUETADO DE LOS ALIMENTOS: RESPUESTA A LOS REQUERIMIENTOS DE SEGURIDAD Y DE MERCADO	14-18 Mar. 05	Zaragoza	IAMZ
	MARKETING DE FRUTAS Y HORTALIZAS EN FRESCO	11-22 Abr. 05	Zaragoza	IAMZ
	ESTRATEGIAS DE MARKETING EN EL MERCADO INTERNACIONAL DEL VINO	16-20 Mayo 05	Zaragoza	IAMZ
	*MARKETING AGROALIMENTARIO	3 Oct. 05/9 Jun. 06	Zaragoza	IAMZ
PESCA Y AGRICULTURA	DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ENFERMEDADES DE PECES EN ACUICULTURA MARINA MEDITERRÁNEA	13-24 Sep. 04	Santiago de Compostela	IAMZ/Univ. Santiago de Compostela
	*ECONOMÍA Y GESTIÓN DE LA ACTIVIDAD PESQUERA	27 Sep. 04/ 18 Mar. 05	Barcelona	Univ. Barcelona/ MAPA/FAO/IAMZ
	*ACUICULTURA	6 Oct. 04/ 8 Abr. 05	Las Palmas de Gran Canaria	ULPGC/ICCM/IAMZ
	DISEÑO Y GESTIÓN DE CRIADEROS DE MOLUSCOS BIVALVOS	14-19 Feb. 05	Zaragoza	IAMZ/FAO
	ESTABLECIMIENTO Y GESTIÓN DE AREAS MARINAS PROTEGIDAS DE INTERÉS PESQUERO	7-12 Mar. 05	Palma de Mallorca	IAMZ/IEO
	USO DE LOS SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA EN PESCA Y ACUICULTURA	13-24 Jun. 05	Zaragoza	IAMZ/AECI
	TRAZABILIDAD DE PRODUCTOS DEL MAR: SISTEMAS Y TÉCNICAS	17-21 Oct. 05	Zaragoza	IAMZ/FAO
	MEJORAS TECNOLÓGICAS EN ARTES DE PESCA PARA UNA GESTIÓN SOSTENIBLE	6-10 Feb. 06	Zaragoza	IAMZ
	ACUICULTURA MEDITERRÁNEA Y GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	24-28 Abr. 06	Murcia	IAMZ/CAA-CARM
	CULTIVO DE ALGAS MARINAS: TÉCNICAS, USOS Y PERSPECTIVAS DE DESARROLLO	22-26 Mayo 06	Zaragoza	IAMZ

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 inscripción pueden solicitarse a la dirección del IAMZ u obtenerse directamente de la página web:

Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza

Apartado 202 - 50080 ZARAGOZA (ESPAÑA)
Teléfono +34 976 716000 - Fax +34 976 716001 - e-mail iamz@iamz.ciheam.org
www.iamz.ciheam.org

INFORMACIÓN PARA AUTORES

De acuerdo con los fines de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA) ITEA publica artículos que hagan referencia a los distintos aspectos de las ciencias agro-alimentarias, cuyo contenido sean resultados obtenidos, descripción de métodos, técnicas o materiales, presentación de nuevas ideas, etc. El envío de un artículo para que se considere su publicación en ITEA implicará que el mismo no haya sido publicado o enviado para publicar en cualquier otro medio de difusión y ha de indicarse expresamente en la carta que acompaña al artículo original. Los derechos sobre todos los artículos o ilustraciones publicados serán propiedad de ITEA, que deberá recibir por escrito la cesión, una vez aceptado el artículo. Sólo los resúmenes de los mismos podrán ser reimpresos.

Se enviarán tres copias en una versión reciente de Word para Windows. La extensión máxima será de 25 folios de texto mecanografiado a doble espacio, tablas y figuras incluidos. Los artículos que superen dicha extensión serán considerados sólo excepcionalmente. Los autores deberán aceptar cualquier modificación editorial en la presentación de los artículos. Los artículos se remitirán a evaluadores expertos en el tema y el autor recibirá las indicaciones que deberán ser atendidas. En caso de desacuerdo, el autor deberá justificarlo debidamente por escrito. Una vez realizadas las correcciones, el autor enviará un sólo ejemplar mecanografiado y una copia en disquete o por correo electrónico. Terminado el proceso de evaluación, se enviará una carta de aceptación al remitente. Los autores recibirán las primeras pruebas de impresión que deberán ser revisadas y devueltas rápidamente a la Redacción. El retraso en el retorno de las pruebas determinará que el artículo sea publicado con las correcciones del Editor.

La publicación de un artículo de ITEA no implica responsabilidad o acuerdo de ésta con lo expuesto, significando solamente que el Comité de Redacción lo considera de suficiente interés para ser publicado. Una vez publicado, los autores recibirán 25 separatas del artículo. El autor podrá encargar separatas adicionales, en cuyo caso se le informará previamente del coste que correrá por cuenta del propio autor. Los originales serán mecanografiados en castellano y enviados a:

Sr. Director de la Revista ITEA
Apartado 202
50080 ZARAGOZA

Los originales deberán mecanografiarse a doble espacio en hojas de tamaño DIN A4, dejando márgenes amplios. Cada página estará numerada, utilizándose hojas separadas para las referencias bibliográficas, las tablas, las figuras y los pies de figuras.

Al principio de cada trabajo se indicará:

- Título. El título no deberá incluir abreviaturas ni fórmulas químicas (excepción de los símbolos químicos para indicar isótopos), y se procurará que sea lo más breve posible.
- Apellido del autor o autores, precedidos de las iniciales del nombre.
- Dirección postal, indicando el autor a quien se va a dirigir la correspondencia, el teléfono y su dirección de correo electrónico.

En la redacción de los trabajos se deberá prestar atención especial al estilo, puntuación, disposición lógica y jerárquica de títulos y subtítulos y al empleo de abreviaturas, las cuáles no deberán utilizarse en el resumen; en el texto deberán aparecer juntas la abreviatura y el nombre completo la primera vez que aparezcan. Se aplicará el Sistema Internacional de Unidades

Dada la diversidad de las colaboraciones que pueden interesar a los lectores de ITEA, se mantendrá un criterio amplio en cuanto se refiere al plan de redacción de los mismos. En general se procurará mantener una disposición lógica, considerando cuidadosamente la jerarquía de títulos, subtítulos y apartados. Se evitará la separación innecesaria de parte del texto en forma de anexos. Todas las colaboraciones constarán en primer lugar de un resumen corto de unas 200 a 250 palabras. Dicho resumen deberá ser comprensible por sí mismo y sin referencias al artículo. Tras el resumen se incluirán las palabras clave, separadas por comas, que sin exceder el número de seis podrán incluir el nombre científico y vulgar de las especies objeto de estudio y la técnica relevante utilizada. En lo posible se evitará incluir palabras que ya figuren en el título y en el resumen, tratando de utilizar sinónimos y palabras derivadas. Además, se adjuntará la traducción al inglés del título, del resumen y de las palabras clave.

En el caso de artículos experimentales, se seguirán los siguientes apartados: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. La introducción deberá explicar la finalidad del artículo. El tema se expondrá de la manera más concisa posible, utilizando un vocabulario preciso y directo. Deberá asimismo, quedar claro qué partes del artículo representan contribuciones propias y cuáles corresponden a aportaciones de otros trabajos. Se podrá incluir un apartado de Agradecimientos antes de la Bibliografía.

Los trabajos experimentales de extensión reducida, podrán publicarse como Nota Técnica. No excederán de 2.000 palabras, incluidos tablas o ilustraciones y deberán incluir la traducción al inglés del Título, Resumen y Palabras Clave.

Además:

- los nombres latinos de géneros, especies y nombres de variedades deben ponerse en cursiva. Los nombres de cultivares entre comillas simples (p.ej., 'Sugar Baby')

- los nombres de los productos químicos deben comenzar con minúsculas (p. ej., progesterona en vez de Progesterona; sulfato de metilo en vez de Sulfato de Metilo).
- los nombres y fórmulas químicas se nombrarán según las normas IUPAC (p. ej., H_2SO_4 en vez de SO_4H_2) y los comerciales se escribirán con la inicial en mayúscula (p.ej., Foligón, Sincrozoo, etc.);
- las llamadas en nota a pie de página o cuadro, que deberán ser las menos posibles y, en todo caso, hechas mediante números correlativos entre paréntesis; ejemplo (1), (2), evitando el uso de asteriscos, letras o cualquier otro signo
- el nivel de significación estadística, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; NS = no significativo, no necesitan explicación.

Tablas y Figuras

- El número de tablas y figuras será reducido al mínimo necesario, y los datos no deben ser presentados al mismo tiempo en forma de tabla y de figura.
- Las tablas, dibujos, gráficos, mapas y fotografías deben acompañarse separadamente al texto, aunque señalando su emplazamiento aproximado. Los dibujos, gráficos, mapas y fotografías deben incluirse como figuras. Las tablas y figuras deben llevar numeración diferente y estar citadas en el texto.
- Los encabezamientos de tablas y los pies de figura deben redactarse de modo que el sentido de la ilustración pueda comprenderse sin necesidad de acudir al texto. Además, se deberá incluir su traducción al inglés. Los gráficos, dibujos y mapas serán presentados con la mayor calidad posible y en blanco y negro excepto en casos excepcionales que deberán ser aceptados por la revista.

Bibliografía

Sólo deberán citarse aquellas referencias relacionadas con el trabajo o que contribuyan a la comprensión del texto. Los autores deben evitar las relaciones exhaustivas de referencias, salvo en el caso de revisiones bibliográficas.

Las referencias en el texto deben hacerse siguiendo los siguientes ejemplos: (Padilla, 1974), (Vallace y Raleigh, 1967), (Vergara et al., 1994). Los nombres de entidades u organismos que figuren como autores, por ejemplo: Dirección General de la Producción Agraria (DGPA), deberán citarse completos en la Bibliografía la primera vez. Las referencias múltiples se harán según se indica en el siguiente ejemplo: (Martinez et al., 1971 y 1979; Ayala y Ortega, 1977). Cuando de un mismo autor o autores exista más de una referencia del mismo año de publicación, se distinguirán unas de otras añadiendo una letra del alfabeto, en minúscula y comenzando por a, al año de publicación (Lorenzo, 1966a; Aparisi, 1970a y b). Si las citas deben hacerse formando parte de la frase en el texto, sólo el año de publicación figurará entre paréntesis: ... como indicaban Gómez et al. (1969) ...

Al final del trabajo y precedida del apartado Bibliografía se hará constar una lista de todas las referencias utilizadas en el texto. Esta lista deberá ordenarse alfabéticamente según el nombre del primer autor de cada trabajo referido. En el caso de incluir varios trabajos del mismo autor, éstos se ordenarán por orden cronológico. En el caso de menciones como "Comunicación personal", "Resultados no publicados", éstas no se harán constar en la Bibliografía.

Ejemplos:

Artículos en revistas:

Demarquilly C, 1969. Valeur alimentaire du maïs fourrage. I. Composition chimique et digestibilité du maïs sur pied. Ann. Zoo-tech. 18: 17-32.

Herrero J, Tabuenca MC, 1966. Épocas de floración de variedades de hueso y pepita. An. Aula Dei 8: 154-167.

Tabuenca MC, 1968a. Necesidades de frío invernal de variedades de peral. An. Aula Dei 9: 1-9.

Tabuenca MC, 1968b. Necesidades de frío invernal de variedades de albaricoquero. An. Aula Dei, 9: 10-24.

Vallace JD, Raleigh RJ, 1967. Protein intake and exercise for pregnant heifers. J. Anim. Sci. 26: 931-936.

Vergara H, Gallego L, Molina A, Torres A, 1994. Efecto del nivel de reservas corporales de las ovejas en el parto y del tipo de cría sobre el crecimiento de corderos de raza manchega. ITEA 90: 73-80.

Comunicaciones de Congresos:

Angel I, 1972. The use of fasciculate form (determinate habit) in the breeding of new Hungarian pepper varieties. Third Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum, 17-24, Universidad de Turín (Italia).

Capítulos de libros:

Gamborg OL, 1984. Plant cell cultures: nutrition and media, pp. 18-26. En: IK Vasil (Ed.). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 1, 825 pp. Academic Press, USA

Para obtener información adicional envíe un mensaje a: mferruz@aragob.es

INSCRIPCIÓN EN AIDA

* Si desea Ud. pertenecer a la Asociación, rellene la ficha de inscripción así como la carta para la domiciliación del pago de la cuota de asociado y envíelas a AIDA. Apto. 727. 50080 Zaragoza.

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

Apellidos..... Nombre.....

Dirección postal

Teléfono

Profesión..... Empresa de trabajo.....

Área en que desarrolla su actividad profesional

CUOTA ANUAL:

Firma.

ITEA 30 €

FORMA DE PAGO:

Cargo a cuenta corriente o libreta

Cargo a tarjeta

Cheque bancario

VISA

Tarjeta número:

MASTERCARD

□□ □□□□□□□□□□□□□□

Fecha de caducidad: /

SR. DIRECTOR DE.....

Muy Sr. mío:

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

Atentamente,

Firmado:

BANCO O CAJA DE AHORROS:

SUCURSAL:

DIRECCIÓN CALLE/PLAZA: N.º

CÓDIGO POSTAL:

POBLACIÓN:

