

Sumario

Producción Animal

Análisis demográfico y genético de la raza ovina Mallorquina
Demographic and genetic analysis of the Mallorquina sheep flockbook
F. Goyache, I. Fernández, M.A. Espinosa, L. Payeras, L. Pérez-Pardal, J.P. Gutiérrez,
L.J. Royo e I. Álvarez 3

Métodos de generación de cerdos transgénicos
Methodologies for generating transgenic pigs
J. Gadea y F.A. García-Vázquez 15

Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal
Applications of transgenic pigs in biomedicine and animal production
J. Gadea y F.A. García-Vázquez 30

Producción Vegetal

Citoquinina para modificar la arquitectura de planta de petunia
Plant architecture modification by cytokinin in Petunia
N. Francescangeli y A. Zagabria 46

Estudio de nutrientes lixiviados bajo cultivo de alstroemeria por aporte de
estiércoles de porcino en un suelo arenoso
*Leaching of nutrients from Alstroemeria cultures on sandy solis fertilized with
pig manure*
R. Miralles de Imperial, J.V. Martín, R. Calvo y M.M. Delgado 53

Análisis demográfico y genético de la raza ovina Mallorquina

F. Goyache^{1,*}, I. Fernández*, M.A. Espinosa**, L. Payeras**, L. Pérez-Pardal*, J.P. Gutiérrez***, L.J. Royo*, I. Álvarez*

* Área de Genética y Reproducción Animal; SERIDA-Somío, C/ Camino de los Claveles 604, 33203 Gijón (Asturias)

** Associació de Ramaders de l'Ovella de Raça Mallorquina, Can Sureda s/n 07509 Son Macià, Manacor (Mallorca), Illes Balears

*** Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n (28040-Madrid)

Resumen

Se ha analizado la información disponible de 6273 animales inscritos en el Libro Genealógico de la Oveja de raza Mallorquina. Se conocían el 34,3% de los padres de los animales registrados y el 7,6% de los abuelos. El intervalo generacional medio en la raza se situó en 3,7 años. El número efectivo de rebaños fundadores (11,1) fue, aproximadamente una cuarta parte del real. El número efectivo de rebaños que proveyeron machos reproductores fue de 8,8 para padres y 3,8 para abuelos. El número equivalente de animales fundadores asciende a 4122, lo que supuso el 66% del total de animales analizados. El número efectivo de animales fundadores fue de 704 (17% de los 6184 fundadores equivalentes). El número efectivo de ancestros que explicarían totalmente la variabilidad genética de la población Mallorquina es de 90. Los valores medios de consanguinidad, relación media y número equivalente de generaciones discretas para los animales analizados fueron de 0,24%, 0,17% y 0,43, respectivamente. Sólo se encontraron 121 animales consanguíneos que presentaron valores medios para los parámetros anteriores de 17,93%, 0,92% y 1,91, respectivamente. Asimismo, se han detectado cuellos de botella locales (dentro de explotación) que provocan la aparición de animales consanguíneos, que pueden ser resueltos con una mínima planificación de los apareamientos sin que exista peligro aparente para la variabilidad genética de la raza.

Palabras clave: genealogías, contribución genética, número efectivo, fundadores, ovino, estructura de la población.

Summary

Demographic and genetic analysis of the Mallorquina sheep flockbook

Information from 6273 registered in the flockbook of the Mallorquina sheep breed was analysed. Up to 34.3% of the individuals had registered parents and 7.6% registered grand-fathers. Average generation interval was 3.7 years. The effective number of founder herds (11.1) was roughly a quarter of the real one. The effective number of herds supplying rams was 8.8 for fathers and 3.8 for grand-fathers. The equivalent number of founders was 4122 which was 66% of the total analysed animals. The effective number of founders was 704 (17% of the equivalent number of founders). The effective number of ancestors for the Mallorquina population was 90, and 50 ancestors would explain 50% of the total genetic variability of the population. Average values for inbreeding, average relatedness and equivalent to discrete generations were 0.24%, 0.17% and 0.43, respectively. Only 121 inbred individuals were found with average values for the former parameters of 17.93%, 0.92% and 1.91. A few within-flock bottlenecks have been detected and, as a consequence, inbred individuals appeared. However, no risk for the genetic variability of the breed arose.

Key words: genealogies, genetic contribution, effective number, founders, ovine, population structure.

1. Autor para correspondencia: Tel. +34 985 19 53 03; Fax +34 985 19 53 10; e-mail: fgoyache@serida.org

Introducción

Los recursos genéticos animales se encuentran entre los bienes más valiosos y estratégicamente importantes que posee un país. Las principales razones para conservar razas de ganado en Europa son las de hacer posible su utilización en el futuro y las razones culturales (Simon, 1999). Las acciones de conservación, entre las que destaca la puesta en marcha de Libros Genealógicos que permiten la identificación sistemática de los animales y la planificación de apareamientos en pureza, tienen como finalidad el mantenimiento del acervo genético de las poblaciones amenazadas (Goyache *et al.*, 2003). El análisis de la información registrada en los Libros Genealógicos permite conocer en profundidad la historia y estructura genética de las poblaciones ganaderas y ha sido ampliamente utilizada en ganado bovino (Gutiérrez *et al.*, 2003), equino (Valera *et al.*, 2005; Cervantes *et al.*, 2009) y ovino (Huby *et al.*, 2003).

La oveja Mallorquina está incluida como raza de protección especial en el Real Decreto 1662/1997, de 7 de noviembre, por el que se actualiza el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España. Es una raza antigua, de gran rusticidad y alta capacidad de adaptación a medios difíciles con condiciones ambientales de sequías y altas temperaturas. Desde 1996 funciona la Associació de Ramaders de l'Ovella de Raça Mallorquina al objeto de la defensa y mejora de la raza. En 2001 el Libro Genealógico gestionado por la Associació de Ramaders fue reconocido oficialmente por el Govern Balear. La raza se encuentra distribuida por todo el territorio de la isla de Mallorca, aunque su mayor concentración se encuentra en el sureste de la misma, con especial importancia en los municipios de Artá, Manacor, Felanitx y Lluchmajor (Esteban Muñoz, 2003). La raza Mallorquina es la población ovina au-

tóctona de mayor censo de las Islas Baleares, especialmente respecto de la raza Roja Mallorquina, cuyos efectivos son de menos de 1000 ejemplares (Esteban Muñoz, 2003). En todo caso, la oveja de raza Mallorquina representa un porcentaje muy pequeño del censo total de ganado ovino en las Islas Baleares, que se sitúa en las 394.631 cabezas, de las que 280.367 son hembras reproductoras (Conselleria d'Agricultura i Pesca, 2007).

El objetivo del presente trabajo es realizar un análisis de la información contenida en el Libro Genealógico de la oveja de raza Mallorquina para conocer la estructura genética de la población y mejorar las estrategias actuales de gestión de reproductores.

Materiales y Métodos

Se ha analizado el Libro Genealógico de la Oveja de raza Mallorquina con los datos disponibles hasta el 1 de febrero de 2006. Esteban Muñoz (2003) ha realizado recientemente una detallada descripción de la historia y evolución de la raza ovina Mallorquina, así como de sus censos y cualidades productivas. A efectos descriptivos se han realizado tablas de frecuencias de número animales (según sexo y año de nacimiento) y ganaderías activas cada año, así como una descripción de la estructura de edad de los animales vivos inscritos en el Libro Genealógico con el paquete estadístico SAS/STAT (1999, SAS Institute, Inc.).

Mediante el programa ENDOG v4.6 (Gutiérrez y Goyache, 2005) se ha realizado un análisis del Libro Genealógico de la raza Mallorquina para conocer: a) su estructura demográfica, b) la concentración del origen de los genes y c) la evolución de la endogamia y la representación genética de los animales en la población.

Estructura demográfica de la raza Mallorquina

Se han analizado los siguientes parámetros:

- el porcentaje de utilización de carneros propios en el rebaño (Vasallo *et al.*, 1986). Mediante este criterio los rebaños incluidos en el Libro Genealógico se clasificarían como núcleos si nunca usan carneros nacidos en otros rebaños, multiplicadores si compran y venden carneros y comerciales si sólo utilizan carneros nacidos en otros rebaños. Los rebaños multiplicadores se dividen en dos niveles (1 y 2) según usen carneros propios (1) o no (2).
- el intervalo generacional, definido como la edad media de los padres a la que nacen sus hijos que luego serán padres. Este parámetro se calculó para las cuatro vías (padre-hijo, padre-hija, madre-hijo y madre-hija) utilizando las fechas de nacimiento de cada individuo y la de sus padres.
- la integridad de la información del Libro Genealógico (MacCluer *et al.*, 1983), que mide la proporción de antepasados presentes en cada generación.
- número equivalente de generaciones discretas, calculado como la suma de $(1/2)^n$, siendo n el número de generaciones que separan el animal de su ascendiente conocido. Este parámetro mide la profundidad del pedigrí de forma comparable a la situación que se daría si en la base de datos no existieran generaciones solapadas. Los individuos sin ascendientes conocidos se asignaron a la generación base.

Concentración del origen de los genes

Se han analizado los siguientes parámetros:

- el número efectivo de rebaños que producen carneros padres, abuelos, bisabuelos y tatarabuelos (Robertson, 1953). Este parámetro se calcula como la inversa de

la probabilidad de que dos animales tomados al azar en la población procedan de carneros del mismo rebaño y resulta informativo sobre la concentración del origen de los animales.

- el número efectivo de fundadores f_e (James, 1972), definido como el número de fundadores que, contribuyendo en igual medida, producirían la diversidad genética existente en una población. Este parámetro se calcula como $f_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^k q_i^2}$, en que q_i es la contribución genética del fundador i a la población.
- el número efectivo de ancestros (Boichard *et al.*, 1997), definido como el número de ancestros, fundadores o no, necesarios para explicar la variabilidad genética total de la población. Este parámetro es complementario al anterior ya que tiene en cuenta los posibles cuellos de botella que hay experimentado la población estudiada, y recoge la variabilidad genética aportada por un animal que no se explica por la contribución de alguno de sus hijos. La población de referencia sobre la que se calculó este parámetro fue la que utiliza el programa ENDOG por defecto, esto es, los animales vivos con padres conocidos.

Endogamia y representación genética

Se han analizado los siguientes parámetros:

- el coeficiente de endogamia (F), definido como la probabilidad de que un individuo posea dos genes idénticos por descendencia.
- el coeficiente de relación media (AR) (Goyache *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2003), definido como el porcentaje de representación genética de cada animal en el conjunto de la población. El coeficiente de relación media es la media de los coeficientes de coascendencia de cada animal con el resto de los animales de la población.

Resultados

El Libro Genealógico de la raza ovina Mallorquina contaba con un total de 8201 animales inscritos, de los que 1928 eran animales fundadores (sin genealogía conocida) que fueron dados de baja antes de aportar algún descendiente al Libro Genealógico por lo que fueron eliminados de sucesivos análisis. De los 6273 (5938 hembras) animales analizados, 5514 (5302 hembras) estaban vivos en el momento del análisis. El total de ganaderías que aportaron animales al Libro fue de 80 aunque el número de ellas que aportaron animales por año de nacimiento del animal fue muy variable, con un máximo de 53. En todo caso, el número de ganaderías que aportaron fundadores al análisis fueron 47 y las explotaciones que aportaron, al menos, 6 inscripciones de animales no fundadores al Libro Genealógico fue de 44. Un 42% de los animales de la población Mallorquina viva registrada tenía en el momento del análisis entre los 3 y 5 años de edad y un 20% de dos años o menos; los animales de 10 o más años de edad fueron el 5,5% de los vivos.

En la raza Mallorquina no se encontraron rebaños que actuaran como núcleos en la forma definida por Vassallo *et al.* (1986), utilizando exclusivamente sus propios sementales y produciendo carneros de los que se nutrirían los restantes rebaños (Tabla 2). Ningún rebaño utilizó exclusivamente sus propios animales como sementales, por lo que no se encontraron rebaños desconectados genéticamente. El 23% de los rebaños se clasificaron como multiplicadores ya que vendieron carneros independientemente de que usaran sus propios carneros como reproductores (18%) o no usaran sus propios carneros (5%). El resto de los rebaños serían rebaños comerciales que no vendieron machos reproductores. En cualquier caso, la utilización de sementales nacidos fuera del rebaño fue de un 72%. Estos resultados caracterizan una raza en la que existe una gran movilidad de reproductores.

La Figura 1 muestra el grado de integridad del pedigrí de la raza ovina Mallorquina. Se conocía el 34,3% de la información sobre los padres de los animales, el 7,6% de la información sobre los abuelos y algo más del 1% sobre los bisabuelos y tatarabuelos. A partir de la quinta generación la información disponible fue prácticamente nula. Por sexos la información disponible fue mayor en los machos que en las hembras, ya que se disponía de información de cerca del 7% de las abuelas paternas y el 9% de los abuelos paternos, mientras que en el caso de las abuelas y abuelos maternos no se superó el 5%.

El intervalo generacional medio en la raza se situó en 3,7 años (Tabla 3) siendo mayor por la vía madre que por la vía padre. El intervalo generacional más prolongado es el de la vía madre-hija (4,5 años). Cuando se consideran solamente los hijos de animales no fundadores utilizados como reproductores para el cálculo de los intervalos generacionales la situación cambia, siendo las vías más cortas las que afectaban al hijo macho (1,8 años).

La Tabla 4 muestra los valores de los parámetros que caracterizan la concentración de origen de un gen en la población Mallorquina. El número efectivo de rebaños fundadores (11,1) fue, aproximadamente, una cuarta parte del real (23,6%). El número efectivo de rebaños que proveyeron machos reproductores (Robertson, 1953) fue de 9 para padres (19% de los reales), 3,8 para abuelos, 3,7 para bisabuelos y 2,0 para tatarabuelos. Los animales fundadores fueron 3961 y, considerando medio-fundadores los animales de los que solamente se conoce uno de los dos padres, el número equivalente de animales fundadores ascendió a 4122, lo que supone el 66% de los animales analizados. El número efectivo de animales fundadores fue de 704 (17% del número equivalente de fundadores). El número efectivo de ancestros (Boichard *et al.*, 1997) que explicarían totalmente la variabilidad genética

Tabla 1. Pirámide de edades de los animales vivos inscritos en el Libro Genealógico de la raza Mallorquina

Table 1. Age structure of the live individuals registered in the Mallorquina sheep breed flockbook

Edad en años	N	Porcentaje
≤1	379	6,88
2	705	12,79
3	902	16,36
4	784	14,22
5	652	11,82
6	491	8,9
7	764	13,86
8	268	4,86
9	265	4,81
10	141	2,56
11	106	1,92
12	47	0,85
≥13	10	0,18

Tabla 2. Clasificación (según Vassallo *et al.*, 1996) de los rebaños incluidos en el Libro Genealógico de la raza ovina Mallorquina (con más de seis inscripciones) según la utilización de machos propios o ajenos. Los rebaños se consideran núcleo si nunca usan carneros nacidos en otros rebaños, multiplicadores si compran y venden carneros y comerciales si sólo utilizan carneros nacidos en otros rebaños. Los rebaños multiplicadores se dividen en dos niveles (1 y 2) según usen carneros propios (1) o no (2)

Table 2. Vassallo et al.'s (1996) classification of the flocks registered in the Mallorquina sheep flockbook according to the use of own or purchased rams. Flocks are classified as nucleus herds, if breeders use only their own rams, never purchase rams but sell them; multiplier herds, when breeders use purchased rams and also sell rams, and commercial herds if they never sell rams. The multiplier and commercial flocks are classified in two different levels (1 and 2) according the use of their own rams (1) or not (2)

Tipo de explotación	Número de Rebaños	Usa carneros comprados	Usa carneros propios	Vende carneros	Porcentaje de carneros comprados
Núcleo	0	No	Sí	Sí	0
Multiplicador 1	8	Sí	Sí	Sí	72
Multiplicador 2	2	Sí	No	Sí	100
Comercial 1	21	Sí	Sí	No	72
Comercial 2	13	Sí	No	No	100
Aislada	0	No	Sí	No	0

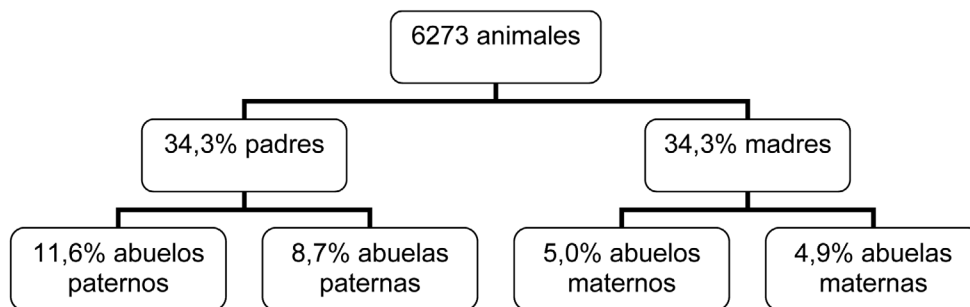


Figura 1. Detalle de la información de pedigrí en la oveja de raza Mallorquina hasta abuelos paternos y maternos

Figure 1. Detail of the pedigree information contained in the Mallorquina sheep breed flockbook up to the grand-fathers level

Tabla 3. Intervalos generacionales (\pm desviación estándar), en años, estimados para 4 vías padre - hijo en la oveja de raza Mallorquina, cuando se consideran todos los animales disponibles y cuando sólo reconsideran los hijos de los animales no fundadores

Table 3. Generation intervals (\pm standard deviation), in years, computed for the four father-offspring pathways in the Mallorquina sheep breed. Results are shown using all available data and using only the offspring of non-founder individuals

Vía padre – hijo	N	Años
Toda la población		
Carnero – hijo	31	3,0 \pm 1,4
Carnero – hija	232	3,0 \pm 1,1
Oveja – hijo	32	3,9 \pm 1,8
Oveja – hija	235	4,5 \pm 2,3
Media	532	3,7 \pm 1,9
Hijos de no fundadores		
Carnero – hijo	6	1,8 \pm 0,4
Carnero – hija	29	2,4 \pm 0,8
Oveja – hijo	3	1,8 \pm 0,5
Oveja – hija	22	2,2 \pm 0,9
Media	60	2,2 \pm 0,8

Tabla 4. Parámetros que caracterizan la concentración de origen de un gen en la población Mallorquina: número efectivo de rebaños que proveen machos reproductores según Robertson (1953), número real y efectivo (entre paréntesis) de rebaños fundadores, número real y efectivo de animales fundadores y número efectivo de ancestros

Table 4. Parameters characterising the probability of gene origin in the Mallorquina sheep breed: effective number of flocks providing rams (Robertson, 1953), real (in brackets) and effective number of founder flocks, real and effective number of founder individuals and Boichard et al.'s (1997) effective number of ancestors

Número real de rebaños fundadores	47
Número efectivo de rebaños fundadores	11,1
Número (efectivo) de rebaños que producen padres	32 (8,8)
Número (efectivo) de rebaños que producen abuelos	9 (3,8)
Número (efectivo) de rebaños que producen bisabuelos	6 (3,7)
Número (efectivo) de rebaños que producen tatarabuelos	2 (2,0)
Número equivalente de animales fundadores (un padre desconocido = medio fundador)	4122
Número de animales fundadores con los dos padres desconocidos	3961
Número efectivo de animales fundadores	704
Número de animales en la población de referencia	1990
Número de ancestros en la población de referencia	1310
Número efectivo de ancestros	90
Número de ancestros que explican el 50% de la variabilidad	50

de la población Mallorquina fue de 90, y 50 ancestros explicarían el 50% de la variabilidad genética de la población.

La Tabla 5 es una lista de los 10 fundadores y ancestros (fundadores o no) de mayor contribución genética al Libro Genealógico de la raza ovina Mallorquina. El fundador y ancestro de mayor importancia fue el 7081, un carnero que explicó el 1,9% y el 5,8%, respectivamente, de la variabilidad genética de la raza. El segundo mayor fundador fue el carnero 582 (1,3%) y el segundo mayor ancestro fue el 805 (3,8%), carnero hijo del cuarto mayor fundador de la raza (581). En todo caso la variabilidad explicada por los fundadores y ancestros listados fue muy baja y a partir del cuarto fundador cada animal explicó menos de un 1% de la variabilidad, siendo, además, la mayor parte de ellos animales nacidos hace pocos años.

La suma de las contribuciones (Tabla 6) de los fundadores o ancestros provenientes de cada explotación informa sobre la importancia de éstas en la formación de la raza Mallorquina. La explotación cuyos fundadores contribuyeron en mayor medida al Libro Genealógico fue la 330292 (12,1%) que se identificó como la cuarta de más importancia en cuanto ancestros. Las 5 primeras explotaciones para fundadores explicaron un 43,8% de la variabilidad genética de la raza mientras que las 5 primeras para ancestros explicaron un 62,6% de la variabilidad, lo que implica una tendencia a la concentración de los pedigrees en unos pocos animales de unas pocas explotaciones. Las cuatro primeras explotaciones para ancestros explican el 53,6% de la variabilidad. En ese mismo sentido, los 10 rebaños listados para fundadores recogen el 61,3% de la variabilidad genética de la raza, mientras que los 10 rebaños listados para ancestros recogen el 81,3%.

Tabla 5. Descripción de los 10 fundadores y de los 10 ancestros (fundadores o no) de mayor importancia en el Libro Genealógico de la raza ovina Mallorquina. Se describe la identificación de los animales, de sus padres y madres, el sexo, el año de nacimiento la relación media (AR) de los fundadores y la contribución (Boichard et al., 1997) de los ancestros, ambos en porcentaje

Table 5. Description of the 10 major founders and ancestors (founders or not) in the Mallorquina sheep flockbook. The table lists the identification of the individuals, their fathers and mothers, their sex and year of birth and, in percentage, the average relatedness (AR) for founders and the Boichard et al.'s (1997) contribution for ancestors

Fundador	Padre	Madre	Sexo	Año de nacimiento	AR
7081			Macho	2001	1,9
582			Macho	1997	1,3
4363			Macho	1999	1,0
581			Macho	1997	1,0
3151			Macho	1997	0,7
502			Macho	1997	0,7
4371			Macho	1999	0,6
8216			Macho	1902	0,6
3367			Macho	1901	0,5
279			Hembra	1995	0,5
Ancestro					Contribución
7081			Macho	1901	5,8
805	581		Macho	1999	3,8
582			Macho	1997	3,5
4363			Macho	1999	2,9
598	276	279	Macho	1998	2,2
3151			Macho	1997	2,1
502			Macho	1997	2,0
8216			Macho	2002	1,9
4371			Macho	1999	1,8
3367			Macho	1901	1,6

Los valores medios de consanguinidad, relación media y número equivalente de generaciones discretas para los animales analizados fueron de 0,24%, 0,17% y 0,43, respectivamente. Sólo se encontraron 121 animales consanguíneos (1,9% del total analizado), que presentaron valores medios para los parámetros anteriores fueron de 17,93%, 0,92% y 1,91, respectivamente. La Figura 2 muestra la evolución de la consanguinidad (F), la relación media (AR) y equivalentes a generaciones discretas en los animales analizados en el Libro Genealógico de la raza ovina Mallorquina. La consanguinidad apa-

reció a partir de 2001 como consecuencia del ligero incremento en la profundidad de pedigrí (0,28 equivalentes a generaciones discretas). La consanguinidad media de los animales nacidos en 2005 llegó al 2,7%, cuando en años anteriores era menor del 1%. Sin embargo los valores de AR fueron siempre bajos (0,6% en los animales nacidos en 2005) por lo que la aparición de animales consanguíneos podría deberse a planificaciones de apareamientos puntuales en ganaderías concretas, sin que resulte un problema para la variabilidad genética de la raza.

Tabla 6. Listado de los 10 rebaños de mayor importancia en el Libro Genealógico de la raza ovina Mallorquina seleccionados por la contribución de sus fundadores y ancestros. Se describe la identificación de la explotación, el número de fundadores (o ancestros) que aportan (N) y la aportación (en porcentaje) genética a la población por fundadores (AR) y por ancestros (Contribución)

Table 6. List of the 10 major flocks for founders and ancestors in the Mallorquina sheep flockbook. It is described the identification of the flock, the number of founders or ancestors (N) and, in percentage, the average relatedness (AR) and the Boichard et al.'s (1997) contribution per flock

Fundadores			Ancestros		
Explotación	N	AR (%)	Explotación	N	Contribución (%)
330292	509	12,1%	330083	56	14,6%
410026	371	10,6%	410026	196	14,2%
330305	381	8,9%	330069	131	12,9%
330069	189	7,1%	330292	108	11,8%
220035	282	5,1%	330305	179	9,0%
330083	46	4,8%	310016	51	4,4%
220140	153	3,6%	330199	53	4,0%
310016	130	3,6%	330339	41	3,7%
330199	95	2,8%	220140	54	3,7%
330306	113	2,7%	330046	37	2,7%

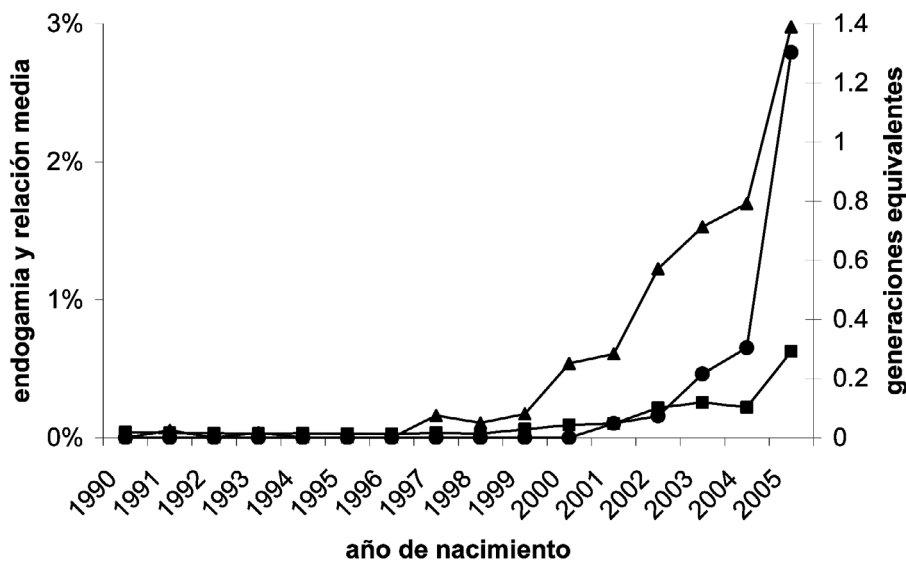


Figura 2. Variación de la endogamia (círculos) y relación media (AR; cuadrados), ambos expresados en porcentaje, en la raza Mallorquina por año de nacimiento de los animales inscritos en Libro Genealógico. Asimismo se muestran los valores medios de generaciones equivalentes (triángulos)
 Figure 2. Variation of the inbreeding (circles) and average relatedness (AR; squares), in percentage, according to year of birth of the individuals registered in the Mallorquina sheep flockbook. Additionally, the values for the discrete generation equivalents are shown (triangles)

Discusión

Aunque el Libro Genealógico de la oveja de raza Mallorquina dispone de registros de animales nacidos desde comienzos de los 90 el inicio real de su funcionamiento se llevó a cabo en los años finales de la década, con aparición de alguna genealogía en 1998. En ese sentido, cabe destacar el esfuerzo de recuperación de animales realizado por la Associació de Ramaders lo que ha permitido tener una amplia base genética para la recuperación consistente en dos tercios de los animales inscritos hasta la actualidad. Por el contrario, el escaso periodo de tiempo transcurrido desde el inicio del funcionamiento efectivo del Libro Genealógico no ha permitido acumular gran cantidad de genealogías pero permite conocer el flujo de genes existente en la raza. Disponer de un 34,3% de padres conocidos puede considerarse normal teniendo en cuenta el gran número de animales fundadores y las dificultades objetivas de obtención de genealogías en ganado ovino. En ese sentido, Huby *et al.* (2003), en seis razas francesas de carne encuentra un porcentaje de animales con los dos padres conocidos que oscila entre el 25 y el 79% para los animales nacidos en los tres últimos años de los treinta de registro genealógico disponibles en algunos casos. Alfonso *et al.* (2006), en Latxa Cara Negra Navarra sometida a control de rendimiento lechero, analizan un pedigrí en que sólo se conocían los dos padres en el 26% de los animales y el 46% carecían de genealogías, señalando las dificultades para obtener genealogías en ganado ovino. Los mismos autores señalan que el porcentaje de animales con ambos padres conocidos en Latxa Cara Rubia y Carranzana es de, aproximadamente, el 20 y el 8%. Estas dificultades han provocado que el número de estudios genealógicos en ganado ovino sea más bien escaso.

Otro aspecto que hace que sea difícil la acumulación de genealogías, especialmente en la vía hembra es el periodo relativamente largo de intervalo generacional entre oveja e hija (4,7 años). Aunque el intervalo intergeneracional medio está en el límite inferior calculado por Huby *et al.* (2003) en seis razas francesas de carne (oscilando entre 3,4 y 4,1 años) la vía madre es notablemente superior a esas razas (oscilando entre 3,8 y 4,5 años). Estos resultados son mayores que los de la raza Xalda de Asturias (3 años; Goyache *et al.*, 2003), población en grave riesgo y de censos muy reducidos cuyos ganaderos realizan un gran esfuerzo de cría. Sin embargo, en razas cuyos censos están formados por animales fundadores cuya carrera reproductiva registrada suele empezar en edades tardías los valores del intervalo entre partos pueden estar sesgados y conviene considerar los calculados utilizando exclusivamente la cría de animales no fundadores. Los intervalos generacionales para los animales no fundadores son notablemente más cortos que para la población general, lo que caracteriza el esfuerzo de cría de los ganaderos y explica la tendencia al rejuvenecimiento de la población que se resume en la Tabla 1. En este caso, los intervalos para producir un semental son siempre más cortos que para producir una hembra reproductora (1,8 frente a más de 2 años) independientemente de considerar la vía madre o padre. Los resultados encontrados en la raza Mallorquina caracterizan un sistema de selección que da gran importancia a la reposición de hembras; los ganaderos precisan más información del rendimiento de un carnero y una oveja antes de decidir que una de sus hijas pase a formar parte de la cría. En todo caso, los intervalos generacionales generales de la raza Mallorquina son comparables con otros valores encontrados en la bibliografía: Prod'Homme y Lauvergne (1993) en un rebaño cerrado de raza Rambouillet calcula

intervalos de 2,2 y 4,1 años para la vía padre y de 3,9 y 5,6 para la vía madre; Djellali *et al.* (1994) encuentran intervalos generacionales medios para las razas Solognote y Merino precoz de entre 2,5 y 3,5 años para la vía padre y de 4,5 años para la vía madre.

Asimismo, el análisis del Libro Genealógico de la oveja de raza Mallorquina permite conocer el flujo de genes existente en la raza. No hay rebaños desconectados genéticamente; todos utilizan carneros nacidos en otros rebaños. Este hecho provocará, a medio plazo, un aumento del parentesco medio dentro de la raza pero limitará el peligro de que los animales de cada ganadería alcancen grados preocupantes de consanguinidad. En todo caso, existen rebaños más eficientes en la recolección de genealogías y que acumulan sus genes (al menos de forma registrada) en la población presente. Estos rebaños no funcionan individualmente como núcleos donantes de sementales al resto de la población sino que comparten sementales entre ellos siendo por tanto, un grupo de selección más difuso que los definidos de forma clásica (Vassallo *et al.*, 1996). Este hecho se demuestra en que si bien 32 explotaciones producen carneros para padrear, las contribuciones de los rebaños están desequilibradas lo que hace que el número efectivo de rebaños para producción de padres (Robertson, 1953) se reduzca a 9.

La base genética de la raza es muy grande, con más de 1000 ancestros que explican la variabilidad genética de la raza. La acumulación de genealogías en unas pocas ganaderías hace que el número efectivo de ancestros (ancestros que contribuirían equitativamente para explicar la variabilidad genética de la raza; Boichard *et al.*, 1997) se reduce a 91 lo que se explica por la presencia de cuellos de botella locales en esas explotaciones. La raza Mallorquina presenta unas medias de consanguinidad y relación media bajas, como resultado de unas genealogías todavía ralas.

Los valores de este parámetro están ligados a la profundidad del conocimiento del pedigrí. Los animales consanguíneos se han acumulado en los últimos seis años y son muy pocos respecto del total de los animales inscritos en el Libro genealógico. Sin embargo, los animales consanguíneos en la población Mallorquina presentan valores de relación media muy bajos. Este bajo grado de relación media entre los animales consanguíneos de la población hace pensar que la consanguinidad encontrada es resultado de la existencia de políticas apareamientos particulares en rebaños concretos que pueden presentar puntualmente un alto grado de endogamia que puede resolverse mediante una mínima planificación de los cruzamientos. El coeficiente *AR* sirve para estimar la consanguinidad a largo plazo originada por el hecho de utilizar un reproductor. Independientemente de que un animal tenga un coeficiente de consanguinidad muy alto porque sus padres tengan antepasados comunes, un coeficiente *AR* bajo significa que un animal comparte un porcentaje pequeño de genes con el resto de la población, por lo que será fácil encontrar individuos con los que pueda aparearse sin crear consanguinidad en los futuros descendientes.

Conclusiones

El Libro genealógico de la raza Mallorquina ofrece una información útil para la realización de acciones de conservación de la variabilidad genética de la raza. Las genealogías se acumulan en un cierto número de ganaderías que son las que presentan un mayor grado de implicación en el esquema de cría de la raza. Asimismo, se ha detectado políticas de cruzamientos dentro de explotación (probablemente realizados en busca de fenotipos deseables) que provocan la aparición de animales consanguíneos. Sin embargo, el flujo de genes

entre ganaderías parece ser importante y limitará, en su caso, la aparición de consanguinidades medias preocupantes para el conjunto de la población. Estos resultados pueden ser útiles a la Associació de Ramaders de l'Ovella de Raça Mallorquina para la mejora de su programa de cría y el mantenimiento de la variabilidad genética de la raza.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el MEC-INIA mediante el proyecto RZ2004-00007-C02.

Bibliografía

- Alfonso L, Parada A, Legarra A, Ugarte E, Arana A, 2006. Effects on genetic variability of selection against scrapie sensitivity in the Latxa black-faced sheep. *Genet. Sel. Evol.* 38: 495-511.
- Boichard D, Maignel L, Verrier E, 1997. The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population, *Genet. Sel. Evol.* 29: 5-23.
- Cervantes, I., Gutiérrez, J.P., Molina, A., Goyache, F., Valera, M. (2009) Genealogical analyses in open populations: the case of three Arab-derived Spanish horse breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 126, 335-347.
- Conselleria d'Agricultura i Pesca, 2007. Estadístiques bàsiques de l'agricultura, la ramaderia i la pesca a les Illes Balears. <http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=MCRST72ZI51209&id=51209> (último acceso el 19 de octubre de 2009).
- Djellali A, Vu Tien Khang J, de Rocambeau H, Verrier E, 1994. Bilan génétique des programmes de conservation de races ovines Solognote et Mérinos précoce. *Genet. Sel. Evol.* 26 Suppl 1: 255s-265s.
- Esteban Muñoz C, 2003. Razas ganaderas españolas ovinas. Edición de MAPA y FEAGAS, 470 pp.
- Goyache F, Gutiérrez JP, Fernández I, Gómez E, Álvarez I, Díez J, Royo LJ, 2003. Using pedigree information to monitor genetic variability of endangered populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. *J. Anim. Breed. Genet.* 120: 95-103.
- Gutiérrez JP, Goyache, F., 2005. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 172-176.
- Gutiérrez JP, Altarriba J, Díaz C, Quintanilla R, Cañón J, Piedrafita J, 2003. Genetic analysis of eight Spanish beef cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 45: 43-63.
- Huby M, Griffon L, Moureaux S, Rochambeau H de, Danchin-Burge C, Verrier E, 2003. Genetic variability of six French meat sheep breeds in relation to their genetic management. *Genet. Sel. Evol.* 35: 637-655.
- James JW, 1972. Computation of genetic contributions from pedigrees. *Theor. Appl. Genet.* 42: 272-273.
- MacCluer J, Boyce B, Dyke L, Weitzkamp D, Pfening A, Parsons C, 1983. Inbreeding and pedigree structure in Standardbred horses. *J. Hered.* 74: 394-399.
- Prod'Homme P, Lauvergne JJ, 1993. The Merino Rambouillet flock in the National Sheep Fold in France. *Small Rumin. Res.* 10: 303-315.
- Robertson A, 1953. A numerical description of breed structure. *J. Agric. Sci.* 43: 334-336.
- Valera M, Molina A, Gutiérrez JP, Gómez J, Goyache F, 2005. Pedigree analysis in the Andalusian horse: population structure, genetic variability and influence of the Carthusian strain. *Livest. Prod. Sci.* 95: 57-66.
- Vassallo JM, Díaz C, García-Medina JR, 1986. A note on the population structure of the Avileña breed of cattle in Spain, *Livest. Prod. Sci.* 15: 285-288.
- Simon DL, 1999. European approaches to conservation of farm animal genetic resources. *AGRI*, 25: 79-99.

(Aceptado para publicación el 23 de octubre de 2009)

Métodos de generación de cerdos transgénicos

J. Gadea¹, F.A. García-Vázquez

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia 30.100 España. <http://www.um.es/grupo-fisiovet>

Resumen

La generación de animales transgénicos ha supuesto una gran revolución biotecnológica en los campos de ciencia y de la salud. El cerdo es un animal de gran importancia en la producción animal, pero también lo es como animal de experimentación usado como modelo de los nuevos procesos biotecnológicos y de las enfermedades humanas. En los últimos 25 años, el desarrollo de la transgénesis porcina ha ido asociado al desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías de biología molecular y de reproducción asistida. En este documento revisamos los métodos empleados hasta el momento para la generación de porcinos transgénicos, analizando tanto las ventajas que cada tecnología ofrece como las limitaciones que las técnicas presentan. Describimos desde los primeros estudios realizados en la transgénesis porcina mediante inyección pronuclear hasta los últimos avances en células madre pluripotenciales inducidas que acaban de ser descritas, pasando por el empleo de los virus, los espermatozoides como mediadores de la transferencia genética y los procesos de transferencia nuclear (clonación). Igualmente aportamos la experiencia acumulada por nuestro grupo de investigación en los últimos años en este apasionante campo de la ciencia.

Palabras clave: cerdo, microinyección, células madre, virus, espermatozoide, técnicas reproductivas.

Summary

Methodologies for generating transgenic pigs

The production of transgenic animals was a great biotechnology revolution in the fields of science and health. Pig is a very important animal for the agriculture industry, but also it is an important lab animal used in models for biotechnological studies and human diseases. In the last 25 years, transgenic pigs have been improved by the development and application of new molecular biology and assisted reproductive technologies. In this manuscript we review the different methodologies used for producing transgenic pigs. We analyze the advantages and limitations that each methodology offers. We describe from the first studies for producing transgenic pigs by pronuclear injection to the latest studies with induced pluripotent stem cells (iPSC) recently described. We also analyze the used of virus, sperm mediated gene transfer and somatic nuclear transfer technology. Finally we contribute with our own experience developed in this amazing field of science by our research group during recent years.

Key words: porcine, virus, microinjection, stem cells, spermatozoa, reproductive techniques.

1. Autor al que dirigir la correspondencia. E-mail: jgadea@um.es

Introducción

Desde el descubrimiento de la doble hélice de ADN en la década de los 50 se abrieron grandes posibilidades para comprender la estructura del material genético y los procesos de la expresión génica. Posteriormente, en la década de los 80 se desarrolló la tecnología capaz de manipular el material genético y producir animales transgénicos. Este desarrollo ha permitido la aplicación del conocimiento en diversos aspectos de la vida, que tiene un beneficio directo sobre toda la humanidad como se pone de manifiesto en el diagnóstico rápido y preciso de enfermedades de origen infeccioso y genético, la selección de animales, el desarrollo de la terapia celular o de la medicina regenerativa, etc.

En este sentido, la posibilidad de crear animales transgénicos que codifiquen un carácter de nuestro interés o anulen algún carácter indeseable, puede tener una gran repercusión en la producción animal y en el desarrollo biotecnológico. La aplicación de esta tecnología permitiría no sólo la obtención de la producción deseada más rápidamente que por la clásica selección natural, sino también trasladar genes de una especie a otra, es decir generar un producto propio de otra especie. Por ejemplo, ya se produce la α -1-antitripsina humana en la leche de cabras modificadas genéticamente que sirve para el tratamiento de los pacientes con enfisema pulmonar y un número importante de agentes farmacológicos producidos de la misma manera están en fase experimental preclínica o clínica (revisado por Dunn *et al.*, 2005).

La producción de estos animales transgénicos es una empresa tecnológicamente compleja, a la par que apasionante, que requiere un amplio equipo multidisciplinar (biología molecular, reproducción asistida, bioseguridad, etc.) y lleva implícito un alto coste económico. Sin embargo, una vez obtenidos los primeros animales transgénicos fundadores,

éstos pueden transmitir el transgén a la prole por mecanismos reproductivos normales, generando un nuevo producto de un gran valor añadido que puede compensar la inversión realizada.

En lo que a la especie porcina se refiere, la historia de los transgénicos da un gran salto cuando dos equipos de investigación en Estados Unidos y Alemania publican en el año 1985 la generación de cerdos transgénicos mediante el empleo de técnicas de inyección pronuclear (Hammer *et al.*, 1985; Brem *et al.*, 1985). Desde entonces hasta nuestros días se ha producido un gran avance en la generación de animales transgénicos con el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías como el uso de vectores virales, de los espermatozoides como mediadores de la transferencia genética, la clonación de las células somáticas y el uso de células madre (*stem cells*) (Tabla 1). Este desarrollo tecnológico ha permitido superar en parte las limitaciones que presentaba la microinyección como método para generar transgénicos (revisado por Nagashima *et al.*, 2003; Bacci, 2007; Niemann y Kues, 2007; Robl *et al.*, 2007).

En estos dos documentos consecutivos pretendemos, por una parte, describir los métodos empleados más frecuentemente para la generación de porcinos transgénicos, planteando las ventajas y limitaciones que cada tecnología presenta. Posteriormente, en un segundo documento, analizaremos las aplicaciones que tienen actualmente y puedan tener estos animales en un futuro próximo tanto en el ámbito de la salud como el de la producción animal.

¿Qué entendemos por cerdo transgénico o modificado genéticamente?

Un cerdo transgénico o modificado genéticamente es aquel al cual se le ha introducido un material genético exógeno (molécu-

Tabla 1. Algunos pasos importantes en la aplicación de tecnologías para la generación de cerdos transgénicos
 Table 1. Some important milestones in the application of the technologies for producing transgenic pigs

Metodología	Características	Referencia
Inyección pronuclear	Primeros cerdos transgénicos mediante virus	Hammer et al., 1985; Brem et al., 1985
Retrovirus aviares	Primeros cerdos transgénicos	Petters et al., 1987
Inyección pronuclear	Uso de ovocitos madurados y fecundados <i>in vitro</i>	Kubish et al., 1995
Transgénesis mediada por espermatozoides	Primeros cerdos transgénicos producidos mediante SMGT	Sperandio et al., 1996
Transgénesis mediada por espermatozoides	Generación de cerdos hDAF	Lavitrano et al., 1997
Lentivirus Leucemia murina de Moloney	Infección de ovocitos	Cabot et al., 2001
Transferencia nuclear	Primeros cerdos transgénicos producidos mediante transferencia nuclear	Park et al., 2001
Transgénesis mediada por espermatozoides e ICSI	Primer lechón transgénico SMGT-ICSI	Lai et al., 2001
Transferencia nuclear	Primeros cerdos transgénicos <i>knock-out</i>	Lai et al., 2002
Lentivirus Leucemia murina de Moloney	Inyección en el espacio perivitelino del cigoto	Hofmann et al., 2003
Lentivirus Anemia infecciosa equina	Inyección en el espacio perivitelino del cigoto	Whitelaw et al., 2004

las de ADN recombinante) de forma intencionada por el hombre para lograr nuevas propiedades. Para lograr que todas las células del organismo expresen este nuevo gen, se incorpora dicho gen en un embrión en estadio de cigoto. Si este ADN exógeno se integra en las células de la línea germinal, podrá ser entonces transmitido a la descendencia de acuerdo a las clásicas leyes mendelianas de la herencia de caracteres.

Actualmente también se diseñan animales transgénicos que tiene anulada una región de su material genético propio y por tanto no pueden expresar ese carácter (*Knock-out*). El uso de los animales *Knock-out* facilita el estudio de la función de un gran número de genes y proteínas. Pero en un sentido más amplio puede entenderse por animal modificado genéticamente aquel al que se le ha introducido el ADN después del nacimiento. Esta es la base de la terapia génica que pretende utilizar los genes como un "medicamento" para el tratamiento de un individuo. O bien, la denominada transferencia genética en testículo (Testis mediated gene transfer, TMGT), que implica la transferencia de genes directamente al testículo y que permitirá producir animales transgénicos mediante el uso de los espermatozoides generados a partir del testículo genéticamente modificado (revisado por Celebi *et al.*, 2003; Coward *et al.*, 2007).

¿Cómo se produce un cerdo transgénico?

Inyección pronuclear

Mediante esta técnica se creó el primer animal transgénico por Gordon *et al.* (1980), basándose en la microinyección de genes directamente en el pronúcleo de ovocitos de ratón recién fecundados. Esta técnica ha sido la más usada en la producción de ratones transgénicos desde la década de los 80

(Gordon y Ruddle, 1981) y a lo largo de los años ha sido adaptada para su uso en animales de granja.

En la especie porcina el proceso comienza con la obtención de cigotos en estado pronuclear o embriones de dos células procedentes de cerdas inseminadas, aunque de forma alternativa también pueden usarse cigotos producidos *in vitro* mediante técnicas de FIV o ICSI (Kubish *et al.*, 1995; Koo *et al.*, 1997). Posteriormente y mediante el empleo de un sistema de micromanipulación embrionaria se inyecta en el pronúcleo pequeños volúmenes de una solución de ADN con agujas de pequeño calibre (Hammer *et al.*, 1985; Brem *et al.*, 1985). El equipo de microinyección consta básicamente de un microscopio invertido y dos brazos de micromanipulación. Uno de ellos está conectado a una pipeta de sujeción, que por presión negativa mantiene fijo el cigoto, por lo que habitualmente se le denomina "*holder*". Una vez que el cigoto está firmemente sujeto, se inyecta el ADN en el interior del núcleo con el empleo de una microaguja adaptada al otro brazo de micromanipulación. Tras este proceso de inyección los embriones son transferidos a una hembra receptora.

En los animales domésticos en general y en concreto en el caso del cerdo, la obtención de embriones en estado pronuclear supone una mayor dificultad técnica y un coste superior a la obtención de embriones murinos. Pero además, la eficiencia de esta técnica de inyección pronuclear es menor en la especie porcina que la conseguida en ratones debido a diversos factores. Primeramente, porque la visualización de los pronúcleos del cigoto se ve dificultada por la presencia de gotas de grasa. Este hecho se puede solventar mediante la centrifugación de los cigotos a alta velocidad (10-15.000 g x 3-5 min.), desplazando las gotas de grasa hacia un polo del cigoto, pero esta centrifugación implica la reducción en las tasas de desarro-

llo embrionario (Wall *et al.*, 1985). Pero sin duda la limitación más importante que presenta esta técnica en la especie porcina, y en general en los animales de granja, es el bajo rendimiento del sistema para integrar el ADN inyectado en el genoma del embrión receptor, la integración es al azar y los problemas en la correcta expresión de las proteínas. Según una revisión de Pursel *et al.* (1990) entre el 0,31 y el 1,73% de los cigotos inyectados llegan a dar lugar a un cerdo transgénico frente a la media del 3% de rendimiento que se obtiene en los ratones.

Otra importante cuestión a tener en consideración es el alto grado de mosaicismo que presentan los animales transgénicos creados mediante inyección pronuclear que puede alcanzar hasta el 60-80% de los animales (Koo *et al.*, 1997). La presencia en un mismo individuo de células que presentan el fenotipo modificado junto con otras células que conservan el fenotipo original, podría estar relacionado no sólo con una integración del transgén de manera desigual en las diversas células, sino también con el sistema de regulación que controla la transcripción y translación, que pudiera silenciar de manera selectiva la expresión de la proteína en algunas blastómeras y no en otras.

Para mejorar el rendimiento de esta técnica de microinyección en la especie porcina se han estudiado diversos factores del proceso como son las condiciones del cultivo, el lugar de inyección, tipo de hembra donante, embrión producido *in vitro* o *in vivo*, tipo y tamaño del ADN, etc. (Willians *et al.*, 1992; Hajdu *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1996; Koo *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2000; Nottle *et al.*, 2001). Del mismo modo, se ha optimizado el proceso de transferencia de los embriones a las cerdas receptoras (sincronía entre donantes y receptoras, número de embriones a transferir, etc) para mejorar los resultados (revisado por Martin y Pinkert, 2002). En cualquier caso y a pesar de las mejoras intro-

ducidas, estudios posteriores han confirmado que la eficiencia de esta técnica en la especie porcina se mantiene estable y difícilmente puede ser mejorada con la tecnología disponible. Así en términos generales consideramos que aproximadamente el 1-2% de los cigotos microinyectados llega a generar un animal transgénico (Hirabayashi *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2001; Nottle *et al.*, 2001).

Transgénesis mediada por virus

Una alternativa a la microinyección pronuclear es el uso de virus que inserten genes exógenos en el genoma del animal a transformar. El virus actúa como un sistema natural de transferencia de ADN a varios tipos de células (Pfeifer, 2004). Esta transferencia puede llevarse a cabo de diversas formas, como son la exposición de las células a una alta concentración de virus, por co-cultivo en monocapa de células infectadas con virus, y mediante la microinyección de los virus directamente en el interior de los blastocistos o en el espacio perivitelino de los cigotos (Petters *et al.*, 1997; Cabot *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2003; Whitelaw *et al.*, 2004).

Para generar animales transgénicos se han utilizado fundamentalmente los retrovirus. Estos son virus con envoltura que presentan un genoma de ARN monocatenario y se replican a través de una forma intermedia de ADN bicatenario mediante la enzima transcriptasa inversa. Este ADN generado se integra en el genoma del hospedador y se comporta como un gen más. Estos virus han sido modificados para que pierdan su carácter patogénico, aunque siguen siendo capaces de infectar células y de transportar una pequeña cantidad de ADN, que aunque limitada, es suficiente para transferir una amplia variedad de construcciones genéticas.

Petters *et al.* (1987) describen por primera vez el uso de retrovirus aviares para infectar

embriones porcinos. Posteriormente se han utilizado retrovirus de la leucemia murina de Moloney para infectar ovocitos que se han fecundado *in vitro* y transferido a una cerda receptora para producir cerdos transgénicos (Cabot *et al.*, 2001). Entre las limitaciones o desventajas del uso de los retrovirus se encuentra primeramente el hecho de que únicamente permiten la transferencia de construcciones de tamaño inferior a 10 kb (revisado por Wall, 2002). Otra desventaja ha sido descrita en numerosos casos en los que la utilización de retrovirus ha permitido la transferencia de los genes, pero estos no son expresados adecuadamente en los animales transgénicos, por lo que la utilidad de estos virus es limitada (revisado por Pfeifer, 2004).

Por último haremos mención a los lentivirus, que se encuentran dentro de la familia de los retrovirus, y que se han utilizado con éxito para producir cerdos transgénicos (Hoffman *et al.*, 2003; Pfeifer, 2004; Whitelaw *et al.*, 2004 y 2008). La principal ventaja del uso de los lentivirus como vectores de transgénesis es la gran eficiencia de la técnica. En este sentido, mientras que el porcentaje de nacidos transgénicos para el porcino se encuentra próximo al 1-2% cuando se utiliza la microinyección pronuclear, con el uso de los lentivirus en la especie porcina se han obtenido entre 3 y 35% según los diferentes estudios (revisado por Park, 2007). Del mismo modo mejoran sustancialmente los niveles de expresión tanto en los fundadores como en la progenie. Por el contrario, como desventajas de esta técnica podemos destacar la inestabilidad de los vectores, la difícil manipulación y preparación de los mismos (Houbine, 2005; Park, 2007). Una vez que se superen los problemas de bioseguridad que aun plantea el uso de virus y los de estabilidad, esta técnica podrá ser de gran aplicabilidad en el futuro próximo, debido a su relativa sencillez y gran eficiencia.

El espermatozoide como vector de la transgénesis

La capacidad de los espermatozoides para capturar ADN exógeno fue descrita por primera vez por Brackett *et al.* (1971) en el conejo. Este descubrimiento y sus importantes implicaciones fueron ignoradas durante casi 20 años, y no es hasta 1989 cuando se demuestra la capacidad que tenían los espermatozoides de ratón de transportar ADN exógeno y transferir estas moléculas al interior del ovocito en el proceso de la fecundación dando lugar a animales modificados genéticamente (Lavitano *et al.*, 1989). Desde entonces esta técnica, denominada transgénesis mediada por espermatozoides (Sperm mediated gene transfer, SMGT), fue objeto del interés de toda la comunidad científica, ya que podría ser considerada, por su relativa sencillez y bajo coste, como la técnica de elección para la producción de animales de granja modificados genéticamente. Sin embargo, las dificultades para repetir los experimentos en otros laboratorios y la baja eficiencia en la integración de los transgenes en el genoma del animal, llevó asociada una considerable controversia durante numerosos años (Brinster *et al.*, 1989; Birnstiel y Busslinger, 1989; Spadafora, 1998). En cualquier caso, usando esta técnica se han descrito porcentajes que se encuentran entre el 5 y el 80% de animales transgénicos del total de nacidos y su eficiencia varía según las especies de aplicación (revisado por Smith y Spadafora, 2005).

En la especie porcina Sperandio *et al.* (1996) describen por primera vez la generación de lechones transgénicos producidos mediante el uso espermatozoides incubados en presencia de ADN exógeno y la aplicación de la dosis de inseminación artificial mediante un procedimiento convencional. Poco tiempo después, el mismo equipo confirmó la generación de animales transgénicos usando

esta misma metodología que expresaban un gen humano (human decay acceleration factor) relacionado con los estudios de xenotrasplantes (Lavitrano *et al.*, 1997, 1999, 2002 y 2003). Posteriormente se utilizó para generar animales poli-transgénicos utilizando en este caso la inseminación laparoscópica (Webster *et al.*, 2005). En cualquier caso, los resultados no son concluyentes ya que la repetitividad de la técnica es muy reducida por factores no bien definidos (Gandolfi *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Nuestra aportación en este campo se ha centrado en analizar los factores que determinan la unión del espermatozoide al ADN exógeno y la eficiencia de la técnica (García-Vázquez, 2007). Entre estos factores se encuentra la presencia de plasma seminal, el tipo de ADN, el origen del espermatozoide, el medio de incubación, los tratamientos espermáticos, etc. (García-Vázquez *et al.*, 2007-2009). Una de las conclusiones más determinantes a las que hemos llegado es el hecho de que en nuestras condiciones experimentales la unión del ADN exógeno se produce a espermatozoides con membrana alterada (García-Vázquez *et al.*, 2009). Este hecho determina que la probabilidad de obtener animales transgénicos haciendo uso de la inseminación o la fecundación *in vitro* es limitada (García-Vázquez *et al.*, 2009). Como alternativa cabe la posibilidad de utilizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) que permiten el uso de espermatozoides independientemente de la alteración de membrana que presenten, como se puso de manifiesto en la especie murina (Perry *et al.*, 1999, Moreira *et al.*, 2004 y 2007). Posteriormente se ha aplicado la ICSI en la especie porcina para generar embriones y animales transgénicos con una mayor eficiencia y repetitividad (Lai *et al.*, 2001; Naruse *et al.*, 2005; Kurome *et al.*, 2007, García-Vázquez *et al.*, 2007-2009, Wu *et al.*, 2009). Mediante la combinación

de la ICSI y SMGT hemos logrado obtener animales transgénicos procedentes de diversas camadas.

Un nuevo abordaje es el que se plantea con la transgénesis activa con el uso de recombinasas o transposasas que puedan mejorar la eficiencia de la transgénesis (Shinohara *et al.*, 2007). En el ratón, el uso de la proteína de origen bacteriano recombinasa A y la proteína Tn5 transposasa incrementan notablemente las tasas de transgénesis tanto usando microinyección como ICSI-SMGT (Kaneke *et al.*, 2005; Suganuma *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2007). En la especie porcina, se ha demostrado la mejora de la eficiencia al usar la proteína recombinasa A procedente de *E. coli* al usar en un sistema de microinyección (Maga *et al.*, 2003) y nuestras experiencias usando la técnica de ICSI-SMGT han puesto de manifiesto que las tasas de embriones que expresan el transgén está próxima al 90% y es posible obtener lechones transgénicos por transferencia de estos embriones (García-Vázquez *et al.*, 2009).

Por otra parte, se han usado adenovirus deficientes en la replicación recombinante para transferir ADN exógeno a células de diferentes tejidos. Un equipo de la Universidad Autónoma de Barcelona (Farre *et al.*, 1999) ha utilizado esta técnica para introducir ADN exógeno a espermatozoides porcinos que utilizados en fecundación *in vitro* e inseminación artificial dieron lugar a embriones y lechones transgénicos.

Células madre

Mediante el empleo de la inyección pronuclear es posible generar grandes animales transgénicos pero con esta tecnología no es posible realizar modificaciones genéticas dirigidas (Gene targeting), lo que aportaría la ventaja de poder elegir el locus que se desea modificar y tener un buen control de la modulación

de ese locus. El uso de la tecnología de las células madre embrionarias (Embryonic stem cells ES) permite hacer modificaciones genéticas dirigidas (Gene targeting).

Las *células madre* (o *stem cells*) son células que tienen la habilidad de dividirse y diferenciarse en varios tipos de células o tejidos. Existen diferentes tipos de células madre: las células madre embrionarias (CME), inducidas (CMI) o adultas (CMA). Las CME y CMI tienen la característica de ser pluripotentes, es decir, pueden derivar a cualquier tipo celular. Sin embargo las CMA son multipotentes, lo que significa que únicamente puede dar lugar a células de su propia línea germinal (ej.: las células hematopoyéticas).

Las CME se aíslan de la masa celular interna (ICM) de los blastocistos y tienen la capacidad para formar quimeras y contribuir a la formación de la línea germinal (Capecchi, 2005). Tras la obtención se procede al cultivo in vitro de estas células madre embrionarias y finalmente se transfieren con la ayuda de un micromanipulador al interior de un blastocisto receptor, para dar lugar finalmente a animales quiméricos, es decir células originarias de 2 cigotos, que tras la fecundación se combinan formando uno solo, por lo tanto el nuevo animal posee dos tipos de células diferentes, cada una con distinta constitución genética.

Las células embrionarias se han desarrollado en ratones desde la década de los ochenta (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981) y más recientemente en ratas (Li *et al.*, 2008), perros (Hatoya *et al.*, 2006) y gatos (Yu *et al.*, 2008). En la especie porcina en la década de los noventa aparecieron las primeras referencias de la derivación de células similares a las embrionarias (ESC-like cells) (Notariani *et al.*, 1990; Piedrahita *et al.*, 1990), pero esas células como otras derivadas de embriones bovinos, caprinos o/y ovinos no cumplen todos los criterios que definen a las verdade-

ras células embrionarias (Ezashi *et al.*, 2009) y a pesar de múltiples esfuerzos, no ha sido posible todavía conseguir estas células embrionarias en estas especies domésticas (revisado por Muñoz *et al.*, 2009). Por lo que algunas de las alternativas que se barajan en los animales de granja son el uso de células germinales embrionarias, células madre espermatogónicas o células madre germinales multipotentes.

Recientemente se ha descrito la generación de células madres pluripotentes inducidas (ipSC) porcinas a partir de células somáticas (Ezashi *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2009). Estas células presentan características similares a las células madres embrionarias y pueden ser una pieza fundamental para el desarrollo biotecnológico en los próximos tiempos (Roberts *et al.*, 2009).

Transferencia nuclear

Como alternativa a la microinyección se encuentra la técnica de transferencia nuclear de una célula somática a un ovocito enucleado que se le conoce por el término de clonación y que ha tenido un gran desarrollo desde la generación de la oveja Dolly (Willmut *et al.*, 1997). El avance de esta tecnología ha permitido un gran impulso en la generación de cerdos transgénicos (revisado por Lai y Prather, 2003). Los primeros cerdos clonados fueron descritos por Polejaeva *et al.* (2000) y rápidamente esta tecnología fue aplicada para generar los primeros cerdos transgénicos que expresaban el marcador GFP (Park *et al.*, 2001) y posteriormente los primeros cerdos knock-out (Lai *et al.*, 2002).

Para llevar a cabo esta técnica, primeramente se aíslan células somáticas (habitualmente fibroblastos fetales porcinos) que son sometidas a un proceso de transformación, de modo que se puede incluir nuevo material genético o anular la expresión de algún

gen. Este proceso de transformación es complejo y poco eficiente; comienza con la obtención de fibroblastos procedentes de fetos porcinos de unos 30-35 días de edad como células donantes del núcleo (revisado por Yanagimachi, 2002). Estas células fetales son sometidas a diversos procesos de transfección como la electroporación o la transfección mediada por lípidos, para conseguir la recombinación homóloga. En la mayoría de los casos la recombinación se produce al azar con integraciones no homólogas. Posteriormente se selecciona la población de células que se han transfectado adecuadamente para finalmente transferir el núcleo de estas células a un ovocito enucleado mediante la ayuda de un micromanipulador e inducir pulsos eléctricos para el inicio del desarrollo embrionario (Kragh *et al.*, 2004).

Las utilidades de la clonación son enormes, desde la clonación de animales en peligro de extinción hasta la generación de animales transgénicos. Esta tecnología es fundamental en el diseño de animales *knock out* como los que se han empleado para la producción de cerdos destinados al xenotrasplante donde se anula la expresión de la enzima α -1,3-galactosil transferasa (Lai *et al.*, 2002; Kolber-Simonds *et al.*, 2004) que reduce el rechazo hiper agudo, o para producir cerdos transgénicos como modelos de la enfermedad de la fibrosis quística (Roger *et al.*, 2008).

A pesar de la utilidad de esta técnica, la eficiencia es sensiblemente baja con valores entre el 1-2% de los ovocitos empleados (revisado por Yanagimachi, 2002; Lai y Prather, 2003). Los problemas están asociados principalmente a fallos en la reprogramación del núcleo transferido, gran mortalidad perinatal y a ciertas anomalías anatómicas y fisiológicas (Ej.: rápido envejecimiento por acortamiento de los telómeros).

Conclusiones y perspectivas de futuro

En los 25 años transcurridos desde la generación de los primeros cerdos transgénicos hasta nuestros días, se ha producido un gran avance en las técnicas y métodos. Sin embargo, este campo de la ciencia aun se encuentra en una fase inicial de desarrollo. Probablemente se verá potenciado en el futuro próximo por la demanda de nuevos modelos que permitan estudiar enfermedades humanas. Es de esperar que para ello se haga uso principalmente de la técnica de transferencia nuclear por las grandes ventajas que aporta en la generación de animales knock-out (Tabla 2). Pero igualmente se potenciará el uso de lentivirus para aprovechar su alto grado de eficiencia, o el uso de los espermatozoides como vectores, una vez que puedan ser resueltos los problemas de repetitividad que ahora adolece. Por otra parte, si se consigue desarrollar el aislamiento y mantenimiento de las células madre embrionarias ayudara a desarrollar nuevos modelos transgénicos. En último término, la inyección pronuclear seguirá disponible para resolver algunos modelos aun cuando su eficiencia sea reducida.

Agradecimientos

A todos los miembros del grupo de investigación Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia y al Dr. Alfonso Gutiérrez-Adán del INIA por el gran trabajo desarrollado en los estudios de transgénesis porcina. Éstos han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos AGL-2006-03495 y AGL-2009-12512-C02-01) y la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia - Fundación Séneca (proyectos 10BIO2005/01-6463 y 08752/PI/08).

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de las diversas tecnologías aplicadas en la generación de cerdos transgénicos
 Table 2. Advantages and limitations of each technologies used for producing transgenic pigs

Metodología	Ventajas	Inconvenientes
Inyección pronuclear	Preparación del ADN sencilla Larga experiencia Interesante para transgénicos knock-in Tamaño de ADN mayor	Dificultad técnica para inyectar zigotos Baja eficiencia (1-2%) Integración en el genoma al azar Alto grado de mosaicismo
Virus	Alta eficiencia (3-35%) Técnica sencilla	Tamaño del gen limitado < 10kb Expresión inadecuada Manipulación de virus compleja (bioseguridad) Baja estabilidad de los virus Integración en el genoma al azar
Transgénesis mediada por espermatozoides	Sencillez de la técnica Posibilidad de uso de la inseminación artificial	Baja repetitividad Bajo rendimiento Integración en el genoma al azar
Transferencia nuclear	Permite multi-transgénesis Permite recombinación homologa Posibilidad de generar knock-out Bajo grado mosaicismo	Complejidad técnica Baja eficiencia de la técnica (0.2-3.4%) Fallos en la programación celular Anomalías anatómicas y fisiológicas en animales nacidos
Células madre embrionarias		Tecnología no disponible

Bibliografía

- Bacci ML. A brief overview of transgenic farm animals. *Vet Res Commun*. 2007 Aug; 31 Suppl 1:9-14.
- Birnstiel ML, Busslinger M. Dangerous liaisons: spermatozoa as natural vectors for foreign DNA? *Cell*. 1989 Jun 2; 57(5):701-2.
- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(2):353-7.
- Brem G, Brenig B, Goodman HM, Selden RC, Graf F, Kruff B, Springmann K, Hondele J, Meyer J, Winnacker EL, Kräusslich H. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 1985, 20: 251-252.
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. No simple solution for making transgenic mice. *Cell*. 1989 Oct 20; 59(2):239-41.
- Cabot RA, Kühholzer B, Chan AW, Lai L, Park KW, Chong KY, Schatten G, Murphy CN, Abeydeera LR, Day BN, Prather RS. Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. *Anim Biotechnol*. 2001 Nov; 12(2):205-14.
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*. 2005 Jun; 6(6):507-12.
- Celebi C, Guillaudeux T, Auvray P, Vallet-Erdtmann V, Jégou B. The making of "transgenic spermatozoa". *Biol Reprod*. 2003 May; 68(5):1477-83.
- Coward K, Kubota H, Parrington J. In vivo gene transfer into testis and sperm: developments and future application. *Arch Androl*. 2007 Jul-Aug; 53(4):187-97.
- Dunn DA, Pinkert CA, Kooyman DL. Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Discov Today*. 2005 Jun 1; 10(11):757-67.
- Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26; 284(26):17634-40.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9; 292(5819):154-6.
- Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 7; 106(27): 10993-8.
- Farre L, Rigau T, Mogas T, García-Rocha M, Canal M, Gomez-Foix AM, Rodríguez-Gil JE. Adenovirus-mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring. *Mol Reprod Dev*. 1999 Jun; 53(2):149-58.
- Gandolfi F, Terqui M, Modina S, Brevini TA, Ajmone-Marsan P, Foulon-Gauzé F, Courot M. Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm. *Reprod Fertil Dev*. 1996; 8(7): 1055-60.
- García-Vázquez FA, García-Roselló E, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology*. 2009 Sep 1; 72(4):506-18.
- García-Vázquez FA, Gumbao D, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Efecto del tratamiento espermático y el tamaño de adn en la interacción transgén- espermatozoide en la especie porcina. *ITEA Información Técnica Económica Agraria*. 28:51-53. 2007.
- García-Vázquez FA, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides eyaculados y epididimarios. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2009. 41.131-138.
- García-Vázquez FA, Ruiz S, Grullón LA, De Ondiz A, Gutiérrez-Adán A, Gadea J. Transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina: evaluación de la calidad seminal en presencia de ADN exógeno y la producción /in vivo/ de embriones transgénicos. *Revista cien-*

- tífica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. (in press)
- García-Vázquez FA. Transgénesis Mediada por Espermatozoides en la Especie Porcina: factores que afectan a la eficiencia de la técnica. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. 2007.
- Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. 1981 Dec 11; 214 (4526):1244-6.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Dec; 77(12): 7380-4.
- Hajdu MA, Knight JW, Canseco RS, Krisher RL, Velandar WH, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Effect of culture conditions, donor age, and injection site on in vitro development of DNA microinjected porcine zygotes. *J Anim Sci*. 1994 May; 72(5):1299-305.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985 Jun 20-26; 315(6021):680-3.
- Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2006 Mar; 73(3):298-305.
- Hirabayashi M, Takahashi R, Ito K, Kashiwazaki N, Hirao M, Hirasawa K, Hochi S, Ueda M. A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit, and pig genomes. *Exp Anim*. 2001 Apr; 50(2):125-31.
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep*. 2003 Nov; 4(11):1054-60.
- Houdebine LM. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim*. 2005 Aug; 40(4): 269-81.
- Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P. Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2005 Nov; 64(8):1704-15.
- Kang JH, Hakimov H, Ruiz A, Friendship RM, Buhr M, Golovan SP. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology*. 2008 Nov; 70(8):1288-96.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 11; 101(19):7335-40.
- Koo DB, Kim NH, Lim JG, Lee SM, Lee HT, Chung KS. Comparison of in vitro development and gene expression of in vivo- and IVM/IVF-derived porcine embryos after microinjection of foreign DNA. *Theriogenology*. 1997 Jul 15; 48(2):329-40.
- Kragh PM, Vajta G, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Callesen H. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev*. 2004; 16(3):315-8
- Kubisch HM, Larson MA, Funahashi H, Day BN, Roberts RM. Pronuclear visibility, development and transgene expression in IVM/IVF-derived porcine embryos. *Theriogenology*. 1995 Aug; 44(3):391-401.
- Kurome M, Saito H, Tomii R, Ueno S, Hiruma K, Nagashima H. Effects of sperm pretreatment on efficiency of ICSI-mediated gene transfer in pigs. *J Reprod Dev*. 2007 Dec; 53(6):1217-26
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002 Feb 8; 295(5557): 1089-92.

- Lai L, Prather RS. Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov 7; 1:82. Review.
- Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy CN, Kühholzer B, Park KW, Bonk AJ, Day BN, Prather RS. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into in vitro matured oocytes. *Zygote.* 2001 Nov; 9(4):339-46.
- Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfé G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E, Rossi G. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29; 99(22):14230-5.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 1989; 57(5): 717-23.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev.* 2003 Mar; 64(3):284-91.
- Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moioli B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplant Proc.* 1997 Dec; 29(8):3508-9.
- Lavitrano M, Stoppacciaro A, Bacci ML, Forni M, Fioretti D, Pucci L, Di Stefano C, Lazzereschi D, Rughetti A, Ceretta S, Zannoni A, Rahimi H, Moioli B, Rossi M, Nuti M, Rossi G, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm-mediated gene transfer. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar; 31(1-2):972-4.
- Li P, Tong C, Mehriani-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell.* 2008 Dec 26; 135(7):1299-310.
- Maga EA, Sargent RG, Zeng H, Pati S, Zarling DA, Oppenheim SM, Collette NM, Moyer AL, Conrad-Brink JS, Rowe JD, BonDurant RH, Anderson GB, Murray JD. Increased efficiency of transgenic livestock production. *Transgenic Res.* 2003 Aug; 12(4):485-96.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec; 78(12):7634-8.
- Martin MJ, Houtz J, Adams C, Thomas D, Freeman B, Keirns J, Cottrill F. Effect of pronuclear DNA microinjection on the development of porcine ova in utero. *Theriogenology.* 1996 Sep; 46(4):695-701.
- Martin MJ, Pinkert CA. Production of transgenic swine by DNA microinjection. In: *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Carl A. Pinkert, editor. Academic Press, San Diego, 2002, 618 pp
- Martin, M.J., Adams, C., Cottrill, F., Houtz, J., Keirns, J., Thomas, D., Byrne, G.W., Diamond, L.E., Kooyman, D.L., Sharma, A. and Logan, J. 2000. The effect of size and molecular concentration of DNA on the production of transgenic swine by pronuclear microinjection. 3rd International Conference on Transgenic Animals, Beijing, China.
- Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jiménez A, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.* 2004 Dec; 71(6):1943-7.
- Moreira PN, Pérez-Crespo M, Ramírez MA, Pozueta J, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A. Effect of Transgene Concentration, Flanking Matrix Attachment Regions, and RecA-Coating on the Efficiency of Mouse Transgenesis Mediated by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biol Reprod.* 2007 Feb; 76(2):336-43.

- Muñoz M, Trigel B, Molina I, Díez C, Caamaño JN, Gómez E. Constraints to progress in embryonic stem cells from domestic species. *Stem Cell Rev Rep*. 2009 Mar; 5(1):6-9.
- Nagashima H, Fujimura T, Takahagi Y, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Esaki R, Kano K, Saito S, Okabe M, Murakami H. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology*. 2003 Jan 1; 59(1):95-106.
- Naruse K, Ishikawa H, Kawano HO, Ueda H, Kurome M, Miyazaki K, Endo M, Sawasaki T, Nagashima H, Makuuchi M. Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J Reprod Dev*. 2005 Aug; 51(4):539-46.
- Niemann H, Kues WA. Transgenic farm animals: an update. *Reprod Fertil Dev*. 2007; 19(6):762-70.
- Notarianni E, Laurie S, Moor RM, Evans MJ. Maintenance and differentiation in culture of pluripotent embryonic cell lines from pig blastocysts. *J Reprod Fertil Suppl*. 1990; 41:51-6.
- Nottle MB, Haskard KA, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Harrison SJ, Barlow H, Wigley PL, Lyons IG, Cowan PJ, Crawford RJ, Tolstoshev PL, Pearse MJ, Robins AJ, d'Apice AJ. Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. *Transgenic Res*. 2001 Dec; 10(6):523-31.
- Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*. 2007 Oct 22; 31(2):159-73.
- Park KW, Cheong HT, Lai L, Im GS, Kühholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*. 2001 Nov; 12(2):173-81.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*. 1999 May 14; 284(5417):1180-3.
- Petters RM, Shuman RM, Johnson BH, Mettus RV. Gene transfer in swine embryos by injection of cells infected with retrovirus vectors. *J Exp Zool*. 1987 Apr; 242(1):85-8.
- Pfeifer A. Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res*. 2004 Dec; 13(6):513-22.
- Piedrahita JA, Anderson GB, Bondurant RH. On the isolation of embryonic stem cells: Comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology*. 1990 Nov; 34(5):879-901.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 2000 Sep 7; 407(6800):86-90.
- Pursel VG, Bolt DJ, Miller KF, Pinkert CA, Hammer RE, Palmiter RD, Brinster RL. Expression and performance in transgenic pigs. *J Reprod Fertil Suppl*. 1990; 40:235-45.
- Roberts RM, Telugu BP, Ezashi T. Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): why they may prove to be important. *Cell Cycle*. 2009 Oct 1; 8(19):3078-81.
- Robl JM, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*. 2007 Jan 1; 67(1):127-33.
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*. 2008 Sep 26; 321(5897):1837-41.
- Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R, Moisyadi S. Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res*. 2007 Jun; 16(3):333-9.
- Smith K, Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays* 2005; 27(5):551-62.
- Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*. 1998 Nov; 20(11):955-64.

- Sperandio S, Lulli V, Bacci ML, Forni M, Maione B, Spadafora C, Lavitrano M (1996) Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Anim Biotechnol* 7: 59-77.
- Suganuma R, Pelczar P, Spetz JF, Hohn B, Yanagimachi R, Moisyadi S. Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis. *Biol Reprod*. 2005 Dec; 73(6):1157-63.
- Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K, Matsuyama N, Niki R, Ikeda JE, Imai H. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res*. 2001 Dec; 10(6):577-82.
- Wall RJ, Pursel VG, Hammer RE, Brinster RL. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol Reprod*. 1985 Apr; 32(3):645-51.
- Wall RJ. New gene transfer methods. *Theriogenology*. 2002 Jan 1; 57(1):189-201.
- Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalprà L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, Mc Kenzie IF, Lavitrano M. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*. 2005 Sep; 72(1):68-76.
- Whitelaw CB, Lillico SG, King T. Production of transgenic farm animals by viral vector-mediated gene transfer. *Reprod Domest Anim*. 2008 Jul; 43 Suppl 2:355-8.
- Whitelaw CB, Radcliffe PA, Ritchie WA, Carlisle A, Ellard FM, Pena RN, Rowe J, Clark AJ, King TJ, Mitrophanous KA. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett*. 2004 Jul 30; 571(1-3):233-6.
- Williams BL, Sparks AE, Canseco RS, Knight JW, Johnson JL, Velandier WH, Page RL, Drohan WN, Young JM, Pearson RE, *et al*. In vitro development of zygotes from prepubertal gilts after microinjection of DNA. *J Anim Sci*. 1992 Jul; 70(7):2207-11.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27; 385(6619):810-3.
- Wu Y, Liu CJ, Wan PC, Hao ZD, Zeng SM. Factors affecting the efficiency of producing porcine embryos expressing enhanced green fluorescence protein by ICSI-mediated gene transfer method. *Anim Reprod Sci*. 2009 Jul; 113(1-4):156-66.
- Wu Z, Li Z, Yang J. Transient transgene transmission to piglets by intrauterine insemination of spermatozoa incubated with DNA fragments. *Mol Reprod Dev*. 2008 Jan; 75(1):26-32.
- Yanagimachi R. Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 22; 187(1-2):241-8.
- Yu X, Jin G, Yin X, Cho S, Jeon J, Lee S, Kong I. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from in vivo-produced cat blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2008 Sep; 75(9):1426-32.
- (Aceptado para publicación el 20 de noviembre de 2009)

Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal

J. Gadea¹, F.A. García-Vázquez

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia 30.100 España. <http://www.um.es/grupo-fisiovet>

Resumen

Los animales transgénicos han supuesto un gran avance en el campo de la ciencia y de la salud. Los avances tecnológicos en este campo han permitido desarrollar una amplia variedad de cerdos transgénicos con diversos objetivos y aplicaciones. En este documento hemos descrito y analizado las diversas aplicaciones que los cerdos transgénicos han tenido y tienen en el ámbito biomédico y en el agropecuario. Entre estas aplicaciones en el campo de la salud destacamos los modelos de enfermedad humana, la generación de productos biofarmacéuticos y el trasplante de órganos de cerdos modificados a humanos (xenotrasplante). Por otra parte, la resistencia a las enfermedades, la mejora de los índices productivos y la reducción del efecto contaminante de la actividad ganadera son las principales aplicaciones de los cerdos transgénicos en producción animal. El uso de cerdos transgénicos está más desarrollado en el campo de la biomedicina que en el agropecuario, fundamentalmente por las limitaciones que existen actualmente en el consumo de productos alimentarios derivados de los organismos modificados genéticamente (OMG's).

Palabras clave: salud, modelos enfermedad, biofármacos, xenotrasplantes, mejora productiva, contaminación.

Summary

Applications of transgenic pigs in biomedicine and animal production

Transgenic animals have been a great improvement for science and health. The latest technological developments have led to the generation of a broad variety of transgenic pigs with diverse aims and applications. In this manuscript, we describe and analyze the usage and applications of the transgenic pigs in biomedicine and agriculture. The applications of transgenic pigs in biomedicine included models for human diseases, production of bio-pharmacological substances and xenotransplantation. The agriculture applications of transgenic pigs are disease resistance, increases in the production and quality of animal products and pollution reduction. The use of transgenic pigs is higher in biomedicine than in agriculture. This is due to the severe restriction of consumption of food products derived from genetic modified organisms (GMO's).

Key words: health, disease model, bio-pharmacology, food products, xenotransplantation, pollution.

1. Autor al que dirigir la correspondencia. E-mail: jgadea@um.es

Introducción

Desde los primeros estudios de la década de los 80 que describían la producción de cerdos transgénicos mediante inyección pronuclear que expresaban la hormona de crecimiento (Pursel *et al.*, 1989) hasta nuestros días, se ha producido un gran avance tecnológico que ha permitido diseñar porcinos transgénicos con diferentes aplicaciones. A continuación pretendemos describir las aplicaciones más importantes de estos animales en el ámbito de la producción animal y de la biomedicina, así como avanzar las líneas de investigación en las que se está trabajando y que podrán hacerse realidad en un futuro próximo.

Aplicaciones en el ámbito biomédico

El desarrollo de los animales transgénicos en general con aplicación en el ámbito biomédico ha tenido una amplia difusión en la últimas dos décadas y las previsiones son que la utilización de modelos transgénicos será aún mayor en los próximos años (Luney, 2007; Matsunari & Nagashiga, 2009).

Este progreso está basado, por una parte, en el avance tecnológico en los campos de la biología molecular y de la reproducción asistida, que posibilita hacer nuevas modificaciones genéticas en las células somáticas y clonaras mediante transferencia nuclear. Por otra parte, existe una demanda creciente de modelos animales de enfermedad y la generación de los animales transgénicos pueden tener un gran incentivo científico y económico, su uso no presenta objeciones éticas infranqueables y está bien aceptado por la sociedad ya que se tiene en consideración que estos animales van a tener una aplicación directa sobre la salud humana.

El ratón es el animal de laboratorio empleado con mayor frecuencia en la investigación biomédica (Grindon & Bhogal, 2005). Este animal presenta diversas particularidades

que hacen de él que sea el modelo de elección. Entre las que se incluye su pequeño tamaño, fácil manejo, reducido coste de adquisición y mantenimiento, intervalo entre generaciones corto, posibilidad de obtener ratones transgénicos con relativa facilidad técnica, etc. Sin embargo, en muchos casos es necesario finalizar los procesos de investigación con animales mayores que confirmen los resultados previos obtenidos con roedores en los estudios de la patogenia de las enfermedades o para evaluar nuevas estrategias terapéuticas (Laible, 2009). Entre las alternativas posibles, la especie porcina se presenta como un buen modelo para el estudio de la fisiología humana. En algunas ocasiones no es posible el uso de los pequeños roedores ya que estos tienen un tamaño reducido para medir los pequeños cambios que se producen en los parámetros fisiológicos. Igualmente, el cerdo es un buen modelo experimental para ciertas enfermedades humanas debido a que su sistema cardiovascular, digestivo e inmune o su piel son anatómica y fisiológicamente más similares al humano que los roedores u otros modelos de animales mayores (Niemann *et al.*, 2009).

En el ámbito de biomédico, el modelo porcino esta siendo utilizado para completar estudios realizados en fases anteriores con modelos de roedor o bien cuando el roedor no satisface los requisitos de los experimentos. Los cerdos transgénicos se han diseñado y utilizado para a) estudiar algunos aspectos importantes de determinadas enfermedades humanas, b) producir biofármacos en la leche o en otros fluidos corporales y c) la producción de órganos porcinos que pudieran ser transplantados a los humanos (xenotrasplantes).

Cerdos transgénicos como modelo de enfermedad humana

En términos generales, el mayor uso de los organismos modificados genéticamente es

el estudio y conocimiento sobre la función y regulación de los genes para su posterior aplicación en la prevención y tratamiento de las enfermedades humanas (Matsunari & Nagashiga, 2009).

Entre el uso de los cerdos transgénicos como biomodelos de enfermedad humana (Tabla 1) destacan los trabajos para generar un tipo porcino de la retinitis pigmentosa (Petters *et al.*, 1997). Estos cerdos expresan un gen mutado de la rodopsina (Pro347Leu) y al igual que en los humanos se produce una pérdida temprana de la mayor parte de los fotorreceptores de tipo bastón de la retina lo que se traduce en una falta de visión en la oscuridad. Además, con el paso del tiempo los conos también degeneran y reducen la señal electrorretinográfica como ocurre en la enfermedad humana. El gran parecido fenotípico entre la enfermedad porcina y humana ha permitido su uso para estudiar las diversas fases de la enfermedad (Tso *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998) y como modelo experimental para ensayar nuevas terapias (Shaw *et al.*, 2001).

Otro ejemplo interesante es el modelo descrito recientemente para estudiar ciertas alteraciones del sistema cardiovascular. Mediante la técnica de transferencia nuclear (clonación) se han producido cerdos minipig que *sobre-expresan* la enzima óxido nítrico sintetasa en las células endoteliales (Hao *et al.*, 2006). La función y estructura vascular y los procesos de hemostasia, así como la modulación del metabolismo del músculo esquelético y cardíaco está regulada en parte por la liberación de óxido nítrico mediada por la sintetasa de óxido nítrico de las células endoteliales. Por tanto este modelo puede ser importante para comprender la función de esta enzima en la regulación del metabolismo muscular y el sistema cardiorrespiratorio.

También cabe destacar los modelos porcinos de la diabetes mellitus que han sido recién-

temente descritos (Umeyama *et al.*, 2008), por la importancia que esta enfermedad tiene en nuestra sociedad. Mediante el uso combinado de técnicas de ICSI y de espermatozoides como vectores de la transgénesis se producen fibroblastos fetales que posteriormente son clonados para producir animales transgénicos. Los animales expresan un factor nuclear 1 alfa del hepatocito (HNF-1alpha) mutado y presentan la hiperglucemia característica de la diabetes mellitus.

Por otra parte, en el año 2008, Rogers *et al.* crearon cerdos transgénicos que sufrían fibrosis quística. Ésta es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva y que se produce por la mutación en el gen que codifica el regulador de la conductancia de transmembrana (CFTR) de los canales de aniones. En esta enfermedad se alteran diversos órganos del enfermo como son el páncreas, hígado, intestino, pulmón, etc. pero realmente es la función respiratoria la más afectada. Estos cerdos han sido producidos por técnicas de transferencia nuclear donde se han utilizado células somáticas modificadas en las que se ha anulado el gen CFTR. Este modelo es realmente equivalente a la enfermedad humana y podrá permitir avanzar en el estudio de la misma. Como hemos comentado anteriormente el ratón es la especie comúnmente más usada para el estudio de enfermedades humanas. Aunque este modelo es satisfactorio en la gran mayoría de los casos, no siempre es el animal de elección. Este es el caso de la fibrosis quística donde los ratones transgénicos producidos no presentaban los síntomas pulmonares ni pancreáticos.

Actualmente se están diseñando nuevos porcinos transgénicos para estudiar enfermedades humanas muy importantes como son la atrofia muscular espinal (Lorson *et al.*, 2008) o diversas enfermedades neurodegenerativas (Lind *et al.*, 2007). Entre ellos destacamos los modelos porcinos de la enfer-

Tabla 1. Algunos ejemplos de cerdos transgénicos producidos como modelos de enfermedad humana
 Table 1. Approaches to generated transgenic pig as models for human diseases

Biomodelos	Características	Metodología	Referencia
Retinitis pigmentosa	Gen mutado de la rodopsina (Pro347Leu)	Microinyección pronuclear	Peters et al., 1997
Cardiovascular	Sobre-expresión de la enzima oxidó ntrico sintetasa en las células endoteliales	Transferencia nuclear	Hao et al., 2006
Fibrosis quística	Gen mutado del regulador de la conductancia de transmembrana	Transferencia nuclear	Roger et al., 2008
Diabetes mellitus	Mutaciones en el factor nuclear 1 alfa del hepatocito (HNF-1alpha)	SMGT-ICSI y posterior clonación de fibroblastos fetales	Umeyama et al., 2008
Alzheimer	Mutación sueca (transgen APP695sw)	Transferencia nuclear	Kragh et al., 2009

medad de Alzheimer que recientemente han sido descritos (Kragh et al., 2009).

En los próximos años esperamos poder aplicar un gran número de modelos porcinos de enfermedad humana (Lunney, 2007), como ahora están disponibles para la comunidad científica miles de cepas de ratones transgénicos que sirven de objeto de estudio para una gran multitud de procesos de enfermedad humana.

Producción de bio-fármacos y bio-moléculas

Tras la generación de los primeros animales transgénicos de granja (Hammer et al. 1985; Brem et al., 1985), parecía razonable aplicar esta tecnología para producir animales transgénicos capaces de secretar de proteínas de interés biológico en la leche, la sangre, u otros órganos y tejidos de los animales transgénicos. En este sentido, la producción de proteínas y otras bio-moléculas con aplicación terapéutica ha tenido un gran desarrollo para su aplicación en enfermedades humanas (revisado por Keefer, 2004; Houbine, 2009).

Esta tecnología se ha aplicado con éxito en los pequeños rumiantes, convirtiendo a esto animales en grandes productores de proteínas de alto valor en su leche, como si fueran bio-reactores, con lo que se facilita enormemente su obtención y purificación. Actualmente están en el mercado los primeros productos bio-farmacéuticos después de un largo periodo de estudio y ensayos clínicos. Entre ellos destacamos la antitrombina recombinante humana producida en cabras transgénicas (ATryn®, GTC Biotherapeutics, USA) que ya está autorizada y disponible en el mercado como anticoagulante para el tratamiento de enfermos con deficiencia hereditaria de la antitrombina. Por otra parte, una proteína recombinan-

te humana el inhibidor de la esterasa C1 (Rhu-cin®, Pharming Group NV, Netherlands) producido en la leche de coneja, está en la fase clínica III y servirá para la terapia de los pacientes que sufren angioedema hereditario.

En cuanto a la especie porcina se refiere se han generado cerdos que producen en su leche proteínas de origen humano que podrían ser de utilidad terapéutica (Wall *et al.*, 1991). Entre estas sustancias se encuentran la proteína C (Velandar *et al.*, 1992), los factores VIII y IX de la coagulación (Paleyanda *et al.*, 1997; Van Cott *et al.*, 1999) para el tratamiento de la hemofilia, la albúmina humana (Naruse *et al.*, 2005), la eritropoyetina (*et al.*, 2006) y recientemente se ha descrito el factor de von Willebrand (Lee *et al.*, 2009) (Tabla 2).

La elección del cerdo para producir factores anti-hemolíticos está basada en la combinación de la capacidad que tiene una cerda transgénica para producir grandes cantidades de leche y la calidad biológica de las proteínas obtenidas (Van Cott *et al.*, 2004). Según los cálculos que describe Lubon *et al.* (1996), una cerda transgénica puede producir de 0,4 a 1,5 litros de leche por ordeño, se puede hacer hasta 5 ordeños por día durante unos 50 días de lactación en cada fase reproductiva y tienen dos por año. De manera que se pueden ordeñar entre 100 y 300 litros de leche por año. Por otra parte, las células epiteliales de la glándula mamaria de las cerdas son las únicas de entre las especies domésticas que completan las modificaciones post-transcripcionales necesarias para que los factores de coagulación VIII y IX tengan actividad biológica (Lindsay *et al.*, 2004).

Por otra parte se han conseguido cerdos que producen hemoglobina humana (Swanson *et al.*, 1992; O'Donnell *et al.*, 1993) que pudiera servir de sustitutivo de la sangre humana. Esta hemoglobina puede ser purificada por una técnica relativamente sencilla

Tabla 2. Algunos ejemplos de cerdos transgénicos productores de sustancias en leche, sangre u órganos con valor terapéutico o farmacológico
 Table 2. Approaches to generated transgenic pig for pharmaceutical production in the mammary gland, blood or tissues

Denominación	Lugar de producción	Metodología	Referencia
Hemoglobina humana	Sangre	Microinyección pronuclear	Swanson <i>et al.</i> , 1992
Proteína C	Leche	Microinyección pronuclear	Velandar <i>et al.</i> , 1992
Factor VII coagulación	Leche	Microinyección pronuclear	Paleyanda <i>et al.</i> , 1997
Factor IX coagulación	Leche	Microinyección pronuclear	Van Cott <i>et al.</i> , 1999
Albúmina humana	Hígado y otros	SMGT-ICSI	Naruse <i>et al.</i> , 2005
Eritropoyetina humana	Leche	Microinyección pronuclear	Park <i>et al.</i> , 2006
Factor von Willebrand	Leche	Microinyección pronuclear	Lee <i>et al.</i> , 2009

lla de cromatografía de intercambio iónico y podría servir como un componente principal del sustituto de la sangre humana.

Igualmente interesantes son las nuevas propuestas para producir proteínas en otros órganos del animal productores de fluidos que permiten una fácil recuperación del material objeto de interés. En este sentido son importantes las propuestas para producir proteínas en las vesículas seminales, ya que estas van a formar parte del plasma seminal como se ha aplicado en el ratón (Dyck *et al.*, 1999) o bien la producción de proteínas recombinantes en la glándula parótida y podrán ser recogidos en la saliva (Golovan *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2007).

Otra alternativa pudiera ser la utilización de la vejiga urinaria o el riñón como un biorreactor lo que permitiría la recogida de proteínas recombinantes en la orina, como ya se ha descrito en el ratón (Kerr *et al.* 1998; Zhu *et al.*, 2003). Las ventajas que presenta este modelo son la facilidad para la recolección de la orina, la abundante cantidad de proteína que puede obtenerse y que permite recogerla durante toda la vida del animal.

En la mayoría de los casos se ha empleado la técnica de inyección pronuclear para generar estos animales, pero recientemente se han publicado los primeros avances en el uso de la transferencia nuclear para generar animales productores de eritropoyetina (Chon *et al.*, 2008) o del factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos humanos (hGM-CSF) (Park *et al.*, 2008).

Xenotrasplantes

En la actualidad, los avances en la medicina han permitido que los trasplantes de órganos sea una práctica rutinaria y que sea el tratamiento indicado para muchos cuadros clínicos que antes no podían ser atendidos. Sin embargo, la realidad demuestra que no

se dispone de los órganos humanos suficientes para cubrir las necesidades crecientes de los mismos (Deschamps *et al.*, 2005). Por tanto las listas de espera son cada vez mayores y muchos pacientes mueren antes de que el órgano adecuado sea encontrado. Por ello se buscan diversas alternativas entre las que se encuentra la posibilidad de utilizar órganos de animales, los llamados xenotrasplantes.

En esta situación, el cerdo se ha convertido en uno de los mejores candidatos para el xenotrasplante debido a su eficiencia reproductiva, a un aceptable intervalo entre generaciones, a que permite mantenerlo en condiciones sanitarias estrictas y a que presenta una relativa similitud anatómica y fisiológica con el humano (Ibrahim *et al.*, 2006). Teniendo en consideración que el xenotrasplante podría ofrecer una solución transitoria, permitiendo al paciente sobrevivir hasta que un órgano humano esté disponible. Aunque los avances en los últimos años han sido muy importantes en este campo, son diversos y complejos los problemas que aún no están resueltos como son el rechazo hiper-agudo de los órganos transplantados, la posibilidad de transmisión de enfermedades latentes a receptores de los órganos como los retrovirus endógenos porcinos (PERV) y aún está por abordar la solución al rechazo crónico (Niemman *et al.*, 2009).

El primer problema a resolver en este complejo trabajo del xenotrasplante es el del rechazo hiperagudo, ya que todos los mamíferos, excepto los humanos y los monos del viejo mundo, expresan en la superficie de las células una glicoproteína con un radical gal a(1-3) gal, de tal manera que estos individuos presentan de forma natural anticuerpos frente a este antígeno que se le denomina anticuerpo xenoreactivo natural (Xna). Cuando se realiza un trasplante de un órgano de un cerdo (hígado, riñón, etc.) a un primate superior (como indicador de lo

que ocurriría en el hombre) se produce una rápida reacción hiper-aguda de rechazo al injerto. Este proceso de rechazo se caracteriza por una trombosis intravascular, pérdida de la integridad del endotelio que permite la extravasación de los componentes sanguíneos y finalmente el órgano transplantado pierde su funcionalidad. Este proceso está mediado por la activación del complemento por complejos antígeno-anticuerpo. La activación del complemento es el componente principal de la patogénesis del rechazo hiper agudo, que funciona como un sistema de enzimas que se activan en cascada y controladas por una serie de proteínas reguladoras (denominadas Decay Acceleration Factor DAF, CD 46, CD 59).

Las estrategias para evitar el rechazo hiper-agudo son, por una parte, evitar la expresión de los antígenos (radical gal a(1-3) gal) en el órgano del donante y por otra parte, reducir la activación del complemento en el receptor con las proteínas reguladoras (Petersen *et al.*, 2009).

Se ha descrito el papel que desarrollan diversas proteínas inhibitoras del proceso de activación del complemento (DAF, CD 46, CD 59) en el rechazo hiper-agudo. En consecuencia, se han generado diversos modelos porcinos que expresan estas proteínas reguladoras y que ha permitido aumentar notablemente la viabilidad del xenotransplante. El primer cerdo transgénico que expresaba DAF (Langford *et al.*, 1994) fue un gran avance, pero solamente el salto cualitativo, se ha conseguido al producir cerdos knock-out que no presentan el gen que codifica la enzima a1,3 galactosiltransferasa, de manera que no se forma el radical gal a(1-3) gal (Lai *et al.*, 2002; Phelps *et al.*, 2003; Kolber-Simons *et al.*, 2004), y también se ha combinado con la introducción del gen de otra transferasa de manera que disminuye el número de residuos antigénicos (Sharma *et al.*, 1996).

Posteriormente se han transferido órganos procedentes de cerdos knock-out y se ha conseguido mantener la viabilidad de un primate transplantado de corazón hasta 6 meses (Kuwaki *et al.* 2005) y más de tres meses la funcionalidad de un riñón transplantado (Yamada *et al.* 2005). Estos experimentos ponen de manifiesto los avances realizados en el control del rechazo hiper-agudo, pero sin duda quedan muchos problemas por solucionar antes de su posible aplicación clínica (Ekser y Cooper, 2008).

Debido a la complejidad del proceso de rechazo, es necesario diseñar nuevos modelos poli-transgénicos que permitan solventar todos los mecanismos de rechazo (Matsunari & Nagashiga, 2009). Estos nuevos modelos pueden generarse a partir de cruzamientos de los animales de las líneas transgénicas ahora existentes y en combinación con la aplicación de las técnicas de transgénesis (microinyección, virus, espermatozoides como vector y transferencia nuclear) (Nottle *et al.*, 2007).

Otros ejemplos interesantes en este campo pueden ser el desarrollado en la producción de cerdos que puedan donar islotes pancreáticos a pacientes humanos que sufren diabetes (Hering y Walawalkar, 2009) o el uso de cartílagos procedentes de cerdos transgénicos que puedan tener aplicación en la cirugía de las articulaciones (Costa *et al.*, 2008). En la actualidad los estudios se encuentran en fase preclínica y en breve comenzará la fase clínica.

Aplicaciones en el ámbito de la producción animal

La transgénesis es una herramienta aplicable a la mejora de la producción animal como hasta ahora lo han sido los sistemas de selección genética convencional (revisado por Laible, 2009). A diferencia de lo que comentábamos previamente en relación al futuro prometedor de los cerdos transgénicos en el

ámbito biomédico, en el ámbito de la producción animal, los progresos técnicos en la transgénesis han permitido desarrollar estudios experimentales con éxito, pero se han quedado en el campo de la investigación y siguen estando lejos de las aplicaciones comerciales (Nieman *et al.*, 2009) (Tabla 3).

En este sentido, actualmente se presenta un problema grave relacionado con la falta de aceptación de la sociedad de los productos alimenticios modificados genéticamente, que son considerados o percibidos por el consumidor como dañinos o peligrosos (Varzacas *et al.*, 2007). Por otra parte, la autorización para comercializar productos derivados de estos animales transgénicos, supone que de acuerdo a la legislación vigente los productos derivados de estos animales deben ser sometidos un complejo, largo y costoso sistema de evaluación de la seguridad alimentaria. En consecuencia, muy pocas empresas pueden tener la capacidad de soportar los costes y el tiempo que conlleva la aprobación por las autoridades sanitarias de los permisos para comercializar los productos, cuando el beneficio esperado no es elevado.

Pasaremos a continuación a describir las experiencias más interesantes en la aplicación de esta tecnología a los sistemas agropecuarios, que se pueden agrupar en tres grandes áreas; las mejoras en la sanidad y bienestar animal, la mejora de los productos de origen animal y finalmente reducir el impacto medioambiental de la actividad ganadera.

Resistencia a enfermedades

En la producción animal las enfermedades de la ganadería suponen un gran problema por las cuantiosas pérdidas económicas que generan de forma directa y las restricciones que los problemas sanitarios suponen en los intercambios comerciales de animales y productos. En este sentido, se ha estimado que los procesos infecto-contagiosos en las gran-

jas suponen unos costes que varían entre un 17% a producción total en los países desarrollados y hasta un 50% en los países en vía de desarrollo (Whitelaw y Sang, 2005). Por tanto, la lucha contra las enfermedades aparece como un importante objetivo a conseguir con el uso de los animales transgénicos que fueran resistentes a las enfermedades comunes o más peligrosas.

La cría de animales resistentes a determinadas enfermedades podría significar un gran avance en la producción animal al reducir el uso de medicamentos y particularmente de antibióticos en algunos casos, mejorar las condiciones de bienestar animal, mejorar las tasas productivas y reproductivas y reducir la frecuencia de transmisión de enfermedades animales a humanos (zoonosis) (Muller y Brem, 1998).

Son de destacar las estrategias diseñadas en ratones por una parte para eliminar los genes relacionados con la susceptibilidad a la enfermedad, y por otra introduciendo nuevos genes que desarrollan resistencia. Utilizando las encefalopatías espongiiformes como ejemplo, por una parte se podría eliminar la susceptibilidad mediante la eliminación del gen PrP por lo que los ratones pierden la susceptibilidad a los priones causantes de las encefalopatías espongiiformes (Weissmann *et al.*, 1996). Mientras que para desarrollar resistencia a la enfermedad, la opción sería transferir genes que codifican anticuerpos capaces de neutralizar la actividad proteica PrP (Heppner *et al.* 2001) por lo que la prevención de esta enfermedad se puede conseguir mediante inmunidad pasiva en estos animales transgénicos.

Un ejemplo específico de la transgénesis porcina aplicada a la resistencia de enfermedades es la producción de cerdos resistentes al virus de la influenza. Para ello se ha utilizado el gen MX1 del ratón que confiere resistencia al virus de la gripe que se ha introducido en cerdos transgénicos. Sin

Tabla 3. Algunos ejemplos de cerdos transgénicos con aplicación en producción animal
 Table 3. Approaches to generated *transgenic pigs for agricultural production*

Objetivo	Características	Metodología	Referencia
Incrementar el índice de crecimiento	Hormona del crecimiento (b-GH)	Microinyección pronuclear	Pursel et al., 1989
Aumentar resistencia a enfermedades	IgA de ratón	Microinyección pronuclear	Lo et al., 1991
Aumentar resistencia frente a influenza porcina	Proteína Mx de ratón	Microinyección pronuclear	Müller et al., 1992
Favorecer desarrollo muscular	CSK de <i>pollo</i>	Microinyección pronuclear	Pursel et al., 1992
Incrementar cantidad de lactosa en leche	α -lactoalbumina bovina	Microinyección pronuclear	Bleck et al., 1998
Aumentar porcentaje de magro	Insulin-like growth factor I (hIGF-1)	Microinyección pronuclear	Pursel et al., 1999 y 2004
Aumentar el aprovechamiento de los fosfatos, reducir contaminación	Fitasa	Microinyección pronuclear	Golovan et al., 2001
Incrementar porcentaje de ácidos grasos insaturados	Enzima desaturasa procedente de las espinacas	Microinyección pronuclear	Saeki et al., 2004
Incrementar porcentaje de ácidos grasos insaturados	Enzima desaturasa procedente de <i>Caenorhabditis elegans</i>	Transferencia nuclear	Lai et al., 2006

embargo, estos animales no son resistentes a la gripe debido a que no se ha conseguido un adecuado control de la expresión de este gen Mx1 (Muller *et al.*, 1992).

Por otra parte, para proteger al animal frente a determinadas enfermedades se puede inducir la producción de anticuerpos específicos frente a las mismas, sin que haya existido contacto previo con el antígeno. También se puede dirigir la producción de anticuerpos en los linfocitos que los liberan al torrente sanguíneo, proporcionando protección frente a enfermedades sistémicas. O bien, puede dirigirse a la producción de anticuerpos en la glándula mamaria, de manera que estos anticuerpos pasarían a los lactantes en el calostro y la leche. En el ganado porcino se han descrito experiencias interesantes en este sentido. Así, se han generado cerdos que producen inmunoglobulinas tipo-A con el objetivo de mejorar la resistencia frente a las infecciones (Lo *et al.* 1991). Por otra, Weidle *et al.* (1991) describen la producción de porcinos que presentan en el suero títulos elevados de anticuerpos monoclonales de ratón, lo que podría servir para proteger a los animales de enfermedades específicas. Posteriormente, un equipo español ha trabajado en la producción de anticuerpos monoclonales en leche frente a coronavirus intestinales como el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (Castilla *et al.*, 1998; Sola *et al.*, 1998).

Estas posibilidades abren un nuevo horizonte en la sanidad animal, sin embargo el desarrollo de esta tecnología en los animales de granja está aún en una fase muy inicial y lejos de una aplicación a gran escala.

Mejoras en el crecimiento y la composición de la canal

Los primeros trabajos de transgénesis en ratón en los que se expresaba la hormona del crecimiento fueron muy alentadores. En

estos estudios se inyectaba a embriones de ratón el gen que codifica la hormona del crecimiento de la rata, de manera que los ratones transgénicos obtenidos tenían un desarrollo corporal entre 2 y 4 veces mayor que el de un ratón normal (Palmiter *et al.*, 1982). Estos estudios en ratón alentaron a la comunidad científica a aplicar esta tecnología para mejorar los índices de crecimiento corporal en diferentes especies domesticas, incluida la porcina.

Los primeros resultados importantes se consiguieron al producir cerdos que expresaban la hormona del crecimiento bovina (Pursel *et al.*, 1989). Los animales producidos mejoraban el índice de crecimiento (10-15% mayor ganancia media diaria) y índice de conversión del alimento (16-18% de aumento) y una reducción del porcentaje de grasa. Pero desafortunadamente, estos animales que expresaban la hormona del crecimiento mostraron determinados problemas de salud, tales como cojeras, úlceras peptídicas, letargias y alteraciones reproductivas (Pursel *et al.* 1989). Estos problemas de salud están asociados a fallos en el control de la expresión del transgén (Cifone *et al.*, 2002).

Otra experiencia interesante fue el uso de el gen c-ski para estimular el desarrollo muscular (Pursel *et al.*, 1992; Pursel y Rexroad, 1993), que induciría un hipertrofia muscular. Sin embargo, los resultados iniciales fueron muy dispares en los diversos animales generados, algunos de los cuales presentaban alteraciones musculares. Esta tecnología ha sido patentada posteriormente (US Patent 6218596).

Para terminar comentaremos que en los últimos años se han diseñado algunos cerdos con el objetivo de modificar las características de la canal. En este sentido, Pursel *et al.* (1999 y 2004) consiguen un cerdo transgénico que expresa Insulin-like Growth Factor I y presenta porcentajes de grasa reduci-

dos y un mayor componente magro siendo éste el producto de mayor interés comercial. Por otra parte, otra aplicación ha sido la de modificar la calidad de la carne para mejorar la calidad de la dieta de los consumidores. El objetivo principal es reducir el porcentaje de grasas saturadas y aumentar la cantidad de ácidos grasos insaturados (como los omega-3 que se encuentra en grandes cantidades en los pescados). Para ello se han utilizado genes que codifican la enzima denaturasa procedentes de las espinacas (Saeki *et al.*, 2004) o bien de *Caenorhabditis elegans* (Lai *et al.*, 2006).

El desarrollo de esta tecnología y la comercialización de los productos derivados de estos animales se ha detenido radicalmente, debido fundamentalmente a que los consumidores no aceptan el consumo de este tipo de alimentos.

Mejora en la producción de leche

La mejora del crecimiento y supervivencia de los animales de granja en sus fases iniciales puede conseguirse a través de la modificación de las características de la leche. Esto requiere la producción de animales transgénicos que produzcan leche: 1) en mayor cantidad, 2) con un alto contenido de nutrientes, 3) y/o que contenga proteínas con un efecto beneficioso.

En algunas especies de producción como la cabra y oveja, los nutrientes que la madre aporta a sus crías no están limitados, sin embargo, la producción de leche en las cerdas limita el crecimiento de los lechones y por lo tanto la producción porcina. Se han creado cerdos transgénicos que contienen el gen bovino α -Lactoalbúmina (α -LA), mediante el cual se mejora la producción y composición de la leche en las cerdas, incrementando hasta un 50% de la concentración total de esta proteína (Bleck *et al.* 1998). La expresión de este transgén lleva

asociado un incremento en la producción de leche y en consecuencia un aumento en el índice de crecimiento y de las tasas de supervivencia de los lechones (Noble *et al.* 2002).

Reducción del efecto contaminante de los purines

La industria porcina es reconocida como una fuente de contaminación de los suelos, por los altos contenidos en fósforo y el nitrógeno que presentan los purines, los cuales si no son bien gestionados contaminan el suelo y el agua. Una solución bastante atractiva a este problema es la generación de cerdos que expresan la enzima fitasa en sus glándulas salivares (Golovan *et al.*, 2001). Estos animales son capaces por tanto de aprovechar el fósforo que está en el alimento en forma de fitato, con el consiguiente ahorro en la formulación de los pienso. Al mismo tiempo al reducir el nivel del fósforo en las heces (entre un 30 y un 70%) se reduce el gran poder contaminante de suelos y aguas subterráneas. Este cerdo desarrollado en la Universidad de Guelph (Canada) a partir de una línea de Yorkside se ha conocido comercialmente con el nombre de Enviro-pig. En la actualidad se encuentra a la espera de autorización para su uso en el consumo humano, que implica un profundo estudio de los potenciales efectos perjudiciales del consumo de estos animales modificados.

Conclusiones y perspectivas de futuro

Como podemos comprobar las aplicaciones de los cerdos transgénicos son muy variadas tanto en el campo biosanitario como el de la producción animal y se desarrollarán en gran medida en las próximas décadas una vez que los avances tecnológicos en esta área permitan aumentar la eficiencia de los procesos y se mejoren las metodologías empleadas.

A la luz de la información ahora disponible las aplicaciones en el ámbito biomédico son las que más se van a desarrollar en un futuro próximo y en concreto la generación de animales que sirvan de modelos de enfermedad tienen mayor campo de desarrollo, fundamentalmente porque el balance entre riesgo beneficio es claramente favorable. Las aplicaciones en el campo de la producción animal están severamente limitadas por las autorizaciones que se necesitan para asegurar la seguridad alimentaria de estos productos.

Agradecimientos

A todos los miembros del grupo de investigación Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia y al Dr. Alfonso Gutiérrez-Adán del INIA por el gran trabajo desarrollado en los estudios de transgénesis porcina. Éstos han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos AGL-2006-03495 y AGL-2009-12512-C02-01) y la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia - Fundación Séneca (proyectos 10BIO2005/01-6463 y 08752/PI/08).

Bibliografía

Bleck GT, White BR, Miller DJ, Wheeler MB. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J Anim Sci.* 1998 Dec; 76(12):3072-8.

Brem G, Brenig B, Goodman HM, Selden RC, Graf F, Kruff B, Springmann K, Hondele J, Meyer J, Winnacker EL, Kräusslich H. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 1985, 20: 251-252.

Castilla J, Sola I, Pintado B, Sánchez-Morgado JM, Enjuanes L (1998) Lactogenic immunity in transgenic mice producing recombinant anti-

bodies neutralizing coronavirus. *Adv Exp Med Biol* 440: 675-86.

Cho SK, Hwang KC, Choi YJ, Bui HT, Nguyen VT, Park C, Kim JH, Kim JH. Production of transgenic pigs harboring the human erythropoietin (hEPO) gene using somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev.* 2009 Apr; 55(2):128-36.

Cifone D, Dominici FP, Pursel VG, Turyn D. Inability of heterologous growth hormone (GH) to regulate GH binding protein in GH-transgenic swine. *J Anim Sci.* 2002 Jul; 80(7):1962-9.

Costa C, Brokaw JL, Fodor WL. Characterization of cartilage from H-transferase transgenic pigs. *Transplant Proc.* 2008 Mar; 40(2):554-6.

Deschamps JY, Roux FA, Saï P, Gouin E. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2005 Mar; 12(2):91-109.

Dyck MK, Gagné D, Ouellet M, Sénéchal JF, Bélanger E, Lacroix D, Sirard MA, Pothier F. Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat Biotechnol.* 1999 Nov; 17(11):1087-90.

Ekser B, Cooper DK. Update: cardiac xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008 Oct; 13(5):531-5.

Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Pollard JW, Fan MZ, Hayes MA, Laursen J, Hjorth JP, Hacker RR, Phillips JP, Forsberg CW. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol.* 2001 Aug; 19(8):741-5.

Grindon C, Bhogal N. The fourth EC report on the statistics of laboratory animal use: trends, recommendations and future prospects. *Altern Lab Anim.* 2005 Aug; 33(4):417-26.

Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature.* 1985 Jun 20-26; 315(6021):680-3.

Hao YH, Yong HY, Murphy CN, Wax D, Samuel M, Rieke A, Lai L, Liu Z, Durtschi DC, Welbern VR, Price EM, McAllister RM, Turk JR, Laughlin MH, Prather RS, Rucker EB. Production of

- endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Res.* 2006 Dec; 15(6):739-50.
- Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rüllicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A. Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science.* 2001 Oct 5; 294(5540):178-82.
- Hering BJ, Walawalkar N. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation. *Transpl Immunol.* 2009 Jun; 21(2):81-6.
- Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009 Mar; 32(2):107-21.
- Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DK. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation.* 2006 Nov; 13(6):488-99.
- Kragh PM, Nielsen AL, Li J, Du Y, Lin L, Schmidt M, Bøgh IB, Holm IE, Jakobsen JE, Johansen MG, Purup S, Bolund L, Vajta G, Jørgensen AL. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res.* 2009 Aug; 18(4):545-58.
- Keefer CL. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci.* 2004 Jul; 82-83:5-12.
- Kerr DE, Liang F, Bondioli KR, Zhao H, Kreibich G, Wall RJ, Sun TT. The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat Biotechnol.* 1998 Jan; 16(1):75-9.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 11; 101(19):7335-40.
- Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med.* 2005 Jan; 11(1):29-31.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science.* 2002 Feb 8; 295(5557):1089-92.
- Lai L, Kang JX, Li R, Wang J, Witt WT, Yong HY, Hao Y, Wax DM, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Starzl TE, Prather RS, Dai Y. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol.* 2006 Apr; 24(4):435-6.
- Laible G. Enhancing livestock through genetic engineering-recent advances and future prospects. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009 Mar; 32(2):123-37.
- Langford GA, Yannoutsos N, Cozzi E, Lancaster R, Elsome K, Chen P, Richards A, White DJ. Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplant Proc.* 1994 Jun; 26(3):1400-1.
- Lee HG, Lee HC, Kim SW, Lee P, Chung HJ, Lee YK, Han JH, Hwang IS, Yoo JI, Kim YK, Kim HT, Lee HT, Chang WK, Park JK. Production of Recombinant Human von Willebrand Factor in the Milk of Transgenic Pigs. *J Reprod Dev.* 2009 Jun 11.
- Li ZY, Wong F, Chang JH, Possin DE, Hao Y, Petters RM, Milam AH. Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Apr; 39(5):808-19.
- Lind NM, Moustgaard A, Jelsing J, Vajta G, Cumming P, Hansen AK. The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007; 31(5):728-51.

- Lindsay M, Gil GC, Cadiz A, Velandar WH, Zhang C, Van Cott KE. Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations. *J Chromatogr A*. 2004 Feb 13; 1026(1-2):149-57.
- Lorson MA, Spate LD, Prather RS, Lorson CL. Identification and characterization of the porcine (*Sus scrofa*) survival motor neuron (SMN1) gene: an animal model for therapeutic studies. *Dev Dyn*. 2008 Aug; 237(8):2268-78.
- Lubon H, Paleyanda RK, Velandar WH, Drohan WN. Blood proteins from transgenic animal bioreactors. *Transfus Med Rev*. 1996 Apr; 10(2):131-43.
- Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*. 2007 Feb 10; 3(3):179-84.
- Müller M, Brenig B, Winnacker EL, Brem G. Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Gene*. 1992 Nov 16; 121(2):263-70.
- Müller M, Brem G. Transgenic approaches to the increase of disease resistance in farm animals. *Rev Sci Tech*. 1998 Apr; 17(1):365-78.
- Naruse K, Ishikawa H, Kawano HO, Ueda H, Kurume M, Miyazaki K, Endo M, Sawasaki T, Nagashima H, Makuuchi M. Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J Reprod Dev*. 2005 Aug; 51(4):539-46.
- Niemann H, Kues W, Carnwath JW. Transgenic Farm Animals: Current Status and Perspectives for Agriculture and Biomedicine. In: Engelhard M, Hagen K, BoysenIn M, eds. *Genetic Engineering in Livestock. New Applications and Interdisciplinary Perspectives*. Berlin, Springer, 2009: 1-30.
- Noble MS, Rodriguez-Zas S, Cook JB, Bleck GT, Hurley WL, Wheeler MB. Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine alpha-lactalbumin in their milk. *J Anim Sci*. 2002 Apr; 80(4):1090-6.
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, Salvaris EJ, Fiscaro N, Pommey S, Cowan PJ, d'Apice AJ. Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation*. 2007 Jul; 14(4):339-44.
- O'Donnell JK, Martin MJ, Logan JS, Kumar R. Production of human hemoglobin in transgenic swine: an approach to a blood substitute. *Cancer Detect Prev*. 1993; 17(2):307-12.
- Paleyanda RK, Velandar WH, Lee TK, Scandella DH, Gwazdauskas FC, Knight JW, Hoyer LW, Drohan WN, Lubon H. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotechnol* 1997; 15:971-975.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-615.
- Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, Seo MK, Han JH, Park CG, Kim HT, Kim YK, Min KS, Kim JH, Lee HT, Chang WK. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs *J Biotechnol*. 2006 Apr 10; 122(3):362-71.
- Park KW, Choi KM, Hong SP, Han GS, Yoo JY, Jin DI, Seol JG, Park CS. Production of transgenic recloned piglets harboring the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene from porcine fetal fibroblasts by nuclear transfer. *Theriogenology*. 2008 Dec; 70(9):1431-8.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*. 2003 Jan 17; 299(5605):411-4.
- Petersen B, Carnwath JW, Niemann H. The perspectives for porcine-to-human xenografts. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009 Mar; 32(2):91-105.
- Petters RM, Alexander CA, Wells KD, Collins EB, Sommer JR, Blanton MR, Rojas G, Hao Y, Flo-

- wers WL, Banin E, Cideciyan AV, Jacobson SG, Wong F. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol.* 1997 Oct; 15(10):965-70.
- Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE. Genetic engineering of livestock. *Science.* 1989 Jun 16; 244(4910):1281-8.
- Pursel VG, Suttrave P, Wall RJ, Kelly AM, Hughes SH.. Transfer of cSKI gene into swine to enhance muscle development. *Theriogenology.* 1992; 37:278. (Abstr.).
- Pursel VG, Rexroad RE Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci (Suppl).* 1993; 71:10-19.
- Pursel VG, Wall RJ, Mitchell AD, Elsasser TH, Solomon MB, Coleman ME, DeMayo F, Schwartz RJ. Expression of insulin-like growth factor I in skeletal muscle of transgenic swine. In: Murray JD, Anderson GB, McGloughlin MM, Oberbauer AM, eds. *Transgenic Animals in Agriculture.* Wallingford, UK: CAB International, 1999:131-144.
- Pursel VG, Mitchell AD, Bee G, Elsasser TH, McMurtry JP, Wall RJ, Coleman ME, Schwartz RJ. Growth and tissue accretion rates of swine expressing an insulin-like growth factor I transgene. *Anim Biotechnol.* 2004 May; 15(1):33-45.
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science.* 2008 Sep 26; 321(5897):1837-41.
- Saeki K, Matsumoto K, Kinoshita M, Suzuki I, Tasaka Y, Kano K, Taguchi Y, Mikami K, Hirabayashi M, Kashiwazaki N, Hosoi Y, Murata N, Iritani A. Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27; 101(17):6361-6.
- Sharma A, Okabe JF, Birch P, Platt JL, Logan JS (1996) Reduction in the level of gal a(1-3) gal in transgenic mice and pigs by the expression of an a(1.2) fucosyl transferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* USA 93:7190-7195.
- Shaw LC, Skold A, Wong F, Petters R, Hauswirth WW, Lewin AS. An allele-specific hammerhead ribozyme gene therapy for a porcine model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2001 Jan 26; 7:6-13.
- Smolenski RT, Forni M, Maccherini M, Bacci ML, Slominska EM, Wang H, Fornasari P, Giovannoni R, Simeone F, Zannoni A, Frati G, Suzuki K, Yacoub MH, Lavitrano M. Reduction of hyperacute rejection and protection of metabolism and function in hearts of human decay accelerating factor (hDAF)-expressing pigs. *Cardiovasc Res.* 2007 Jan 1; 73(1):143-52.
- Sola I, Castilla J, Pintado B, Sánchez-Morgado JM, Whitelaw CB, Clark AJ, Enjuanes L (1998) Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk. *J Virol* 72:3762-3772.
- Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell JK, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S, Logan JS. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology (N Y).* 1992 May; 10(5):557-9.
- Tso MO, Li WW, Zhang C, Lam TT, Hao Y, Petters RM, Wong F. A pathologic study of degeneration of the rod and cone populations of the rhodopsin Pro347Leu transgenic pigs. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1997; 95:467-79.
- Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H. Expression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 alpha transgene leads to impaired islet development and diabetes in pigs. *Proceedings of the Swine in Biomedical Research Conference.* San Diego, 2008 abstract 54.
- Van Cott KE, Butler SP, Russell CG, Subramanian A, Lubon H, Gwazdauskas FC, Knight J, Drohan WN, Velander WH. Transgenic pigs as bio-reactors: a comparison of gamma-carboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland. *Genet Anal Biomol Eng* 1999; 15:155-160.

- Van Cott KE, Monahan PE, Nichols TC, Velandier WH. Haemophilic factors produced by transgenic livestock: abundance that can enable alternative therapies worldwide. *Haemophilia*. 2004 Oct; 10 Suppl 4:70-6.
- Varzakas TH, Arvanitoyannis IS, Baltas H. The politics and science behind GMO acceptance. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007; 47(4):335-61.
- Velandier WH, Johnson JL, Page RL, Russell CG, Subramanian A, Wilkins TD, Gwazdauskas FC, Pittius C, Drohan WN. High level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:12003-12007.
- Wall RJ, Pursel VG, Shamay A, McKnight RA, Pittius CW, Hennighausen L. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 1; 88(5):1696-700.
- Weissmann C, Fischer M, Raeber A, Büeler H, Sailer A, Shmerling D, Rüllicke T, Brandner S, Aguzzi A (1996) The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Int J Exp Pathol* 77:283-293.
- Whitelaw CB, Sang HM. Disease-resistant genetically modified animals. *Rev Sci Tech*. 2005 Apr; 24(1):275-83.
- Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'Malley P, Nobori S, Vagefi PA, Patience C, Fishman J, Cooper DK, Hawley RJ, Greenstein J, Schuurman HJ, Awwad M, Sykes M, Sachs DH. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med*. 2005 Jan; 11(1):32-4.
- Yan X, Voutetakis A, Zheng C, Hai B, Zhang C, Baum BJ, Wang S. Sorting of transgenic secretory proteins in miniature pig parotid glands following adenoviral-mediated gene transfer. *J Gene Med*. 2007 Sep; 9(9):779-87.
- Zhu X, Cheng J, Huang L, Gao J, Zhang ZT, Pak J, Wu XR. Renal tubule-specific expression and urinary secretion of human growth hormone: a kidney-based transgenic bioreactor growth. *Transgenic Res*. 2003 Apr; 12(2):155-62.
- (Aceptado para publicación el 20 de noviembre de 2009)

Citoquinina para modificar la arquitectura de planta de petunia

N. Francescangeli, A. Zagabria

EEA INTA San Pedro. Ruta 9 Km 170 – C.C. 43 – B2930 ZAA San Pedro, Argentina.

E-mail: nfrances@correo.inta.gov.ar

Resumen

Se obtuvo información sobre los efectos de la citoquinina 6-bencilaminopurina (BA) en diversos parámetros fenométricos de petunia y se ponderó su valor agronómico para modificar la arquitectura de la planta. En un experimento realizado en la Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro (Lat.: 33° 41' S Long.: 59° 41' W), provincia de Buenos Aires, Argentina, se compararon cuatro concentraciones de BA: 0, 5, 10 y 15 mg L⁻¹; aplicadas por aspersión en tres momentos del ciclo: a aparición visible de primer pimpollo, a 7 días y a 14 días después de la aparición visible de pimpollo.

A concentraciones crecientes de BA, hasta 15 mg. L⁻¹: disminuyeron la altura de las plantas, el peso seco de raíces y flores, y el número de hojas; aumentaron el peso seco del conjunto hojas y tallos, el largo promedio de las hojas, el área foliar individual y el índice de compactidad. No se detectaron efectos de los tratamientos sobre el número de ramas y de flores, la producción total de materia seca, el área foliar total de las plantas, el ancho promedio de las hojas ni el perímetro promedio de las hojas.

De los resultados obtenidos con la aplicación de BA en petunia, puede asignarse el mayor valor agronómico a la producción de plantas más bajas y compactas, desafío primario para el productor de especies florales en maceta.

Palabras clave: arquitectura de planta, regulador de crecimiento, BA, *Petunia x hybrida*.

Summary

Plant architecture modification by cytokinin in Petunia

Data on the effects of the cytokinin 6-bencilaminopurine (BA) in various phenometric parameters of petunia were registered and their agronomic value to modify plant architecture was examined. In an experiment conducted at the Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro (Lat. 33 ° 41 'S Long.: 59 ° 41' W), province of Buenos Aires, Argentina, four concentrations of BA: 0, 5, 10 and 15 mg L⁻¹, applied by spraying three times in the cycle: a visible appearance of the first bud, at 7 days and 14 days after the onset of visible bud were compared.

At increasing concentrations of BA, up to 15 mg. L⁻¹: decreased plant height, dry weight of roots and flowers, and the number of leaves; increased the dry weight of all leaves and stems, the average length of leaves, individual leaf area and compactness index. We detected no effects of treatments on the number of branches and flowers, the total dry matter production, total leaf area of plants, the average width of the leaves and the average perimeter of the leaves.

From the results obtained with the application of BA in petunia, the highest agronomic value can be allocated in the production of lower and compact plants; primary challenge for the producer of potted flowering species.

Key words: plant architecture, plant growth regulator, BA, *Petunia x hybrida*.

Introducción

Las petunias (*Petunia x hybrida*) son unas de las plantas más populares de la estación cálida en el mundo dadas su versatilidad y variedad. Debido al continuo mejoramiento a que se ha sometido la especie desde la década de 1970, actualmente se dispone de una amplia gama de colores, dos hábitos de crecimiento (erecto y colgante) y numerosos híbridos y cultivares de flores simples y dobles (entre 400 y 500) (Kessler, 1998). Al igual que otras especies de maceta, la petunia se ha convertido en un desafío para el floricultor que busca aumentar la calidad de su producción con ejemplares bajos y compactos.

Los reguladores de crecimiento actúan modificando el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de su acción sobre vías y pasos bioquímicos específicos, así, algunos, como las citoquininas, actúan como símiles hormonales, y por sus favorables características de baja toxicidad son candidatos apropiados para ser incorporados en sistemas de manejo con reducido impacto ambiental (Retamales, 2007).

Otros, en cambio, recomendados comercialmente para petunia: paclobutrazol, ancymidol, daminozide y uniconazol (Latimer, 2001) dejan residuos en el ambiente; particularmente, el inhibidor del ácido giberélico paclobutrazol que persiste en el suelo por largos períodos (Barrett, 2002).

Las citoquininas son un grupo de fitohormonas que juegan un rol muy importante en el crecimiento y desarrollo de la planta, resultando su actividad en la morfogénesis y en el metabolismo muy dependiente de factores ambientales (Hirose *et al.*, 2008).

En diversas especies florales, se ha demostrado que las citoquininas favorecen todos los procesos asociados al crecimiento y al desarrollo, disminuyendo la pérdida de pigmentos fotosintéticos y proteínas al modifi-

car positivamente las actividades de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (Divo de Sesar, 2005).

Nishijima *et al.* (2006) encontraron una relación directa entre el contenido de 6-bencilaminopurina (BA) y el tamaño de la corola de petunia, y atribuyeron como efecto de la fitohormona un incremento en el número de células.

Taverner *et al.* (1999) observaron que la aplicación de citoquininas retrasaba la senescencia de las flores de petunia, dependiendo de la respuesta del tipo y concentración de citoquinina y del estado de desarrollo de la flor.

Los efectos de las citoquininas en el tamaño de las hojas fueron investigados en distintas especies (Kamisaka and Miyamoto, 1994) y se ha demostrado que generalmente provocan un aumento del tamaño de la hoja debido al alargamiento celular (Letham, 1969; Tsui *et al.*, 1980).

El objetivo del trabajo fue obtener información sobre los efectos de la citoquinina BA en diversos parámetros fenométricos de petunia y ponderar su valor agronómico para modificar la arquitectura de la planta.

Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria San Pedro, Provincia de Buenos Aires, Argentina (33°4' S, 59°4' O), durante la primavera de 2008. El cultivar de petunia utilizado fue 'Ultra White' (Ball Seeds): tipo grandiflora, flores blancas, simples, fragantes, grandes; hojas pequeñas; hábito erecto. El trasplante se realizó el 5 de noviembre de 2008 desde bandejas con 240 plántulas, al estado de dos hojas verdaderas, adquiridas en un vivero comercial.

Los tratamientos consistieron en cuatro concentraciones de BA (reactivo pro-análisis): 0, 5, 10 y 15 mg L⁻¹; aplicadas por aspersión en tres momentos del ciclo: 1) a aparición visible de primer pimpollo, 2) a 7 días de 1 y 3) a 14 días de 1.

El cultivo se condujo en macetas de polietileno negro de 1 L de capacidad, 12 cm de altura y 12 cm de diámetro, con sustrato comercial compuesto por diferentes tipos de turbas, humus de lombriz y perlita (Grow Mix® Standard, Terraferil S.A., Moreno, Argentina) (densidad aparente 0,083 kg m⁻³; porosidad 22,4%; retención de agua 61,7%). Las macetas se dispusieron en un invernadero sobre mesas de cultivo, a una densidad de 55 plantas m⁻², con riego por goteo localizado (un vástago por maceta, caudal horario de 4 L). Semanalmente se aplicó fertilización por riego con una solución de NPK (1:0, 22:1,4) y micronutrientes. A lo largo del ciclo del cultivo el pH se mantuvo en el rango 5,5 a 6,5 y la conductividad eléctrica entre 1,2 y 2,2 dS n⁻¹. Tanto el riego como la fertilización fueron similares para todas las plantas.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con 20 plantas por tratamiento y tres repeticiones. Sobre todas las plantas de cada parcela se observó la fecha de aparición visible de primer pimpollo.

A las 6 semanas del transplante se registraron las siguientes variables:

- 1) *Generales*, sobre 10 plantas de cada tratamiento: altura de planta, número de ramas y número de flores.
- 2) *Materia seca*, sobre las mismas 10 plantas de cada tratamiento: peso seco de raíz (luego de un lavado cuidadoso), peso seco de (ramas + hojas) y peso seco de flores; luego de secado en estufa a 75° C durante 72 horas. Se calcularon las relaciones total aéreo:total y flores:total.
- 3) *Foliales*, sobre 4 plantas: largo de hoja, ancho de hoja, perímetro de hoja y área

foliar de cada hoja; mediante un medidor de área foliar CI-202 (CID, Inc). Se contó el número de hojas de cada planta y se calculó el área foliar total.

Además, se calculó como índice de compactidad la relación entre el peso seco aéreo y la altura.

Con un adquisidor automático de datos Watch Dog® se obtuvieron a nivel del dosel vegetal registros de radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura y humedad relativa del aire durante todo el ciclo del cultivo (frecuencia 15 minutos).

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa SAS y sus procedimientos (SAS Institute, 1989). Se aplicó la prueba de no aditividad de Tukey para confirmar la distribución normal de los datos, los que se sometieron al análisis de varianza ($\alpha = 0,05$). Se compararon los tratamientos con la prueba de Tukey para medias ajustadas ($\alpha = 0,05$) y se determinaron los mejores ajustes lineales, cuadráticos o cúbicos entre las variables y las concentraciones de BA ($\alpha = 0,05$).

Resultados y discusión

Situación climática

Durante las 6 semanas de cultivo, los promedios de temperatura y humedad en que se desarrollaron las plantas fueron 25,0° C y 62%. La PAR acumulada hasta el estadio de primer pimpollo formado fue de 303 moles PPF m⁻² s⁻¹ y hasta la cosecha, 852 moles PPF m⁻² s⁻¹.

Efectos de las concentraciones de BA

El momento de aparición visible de primer pimpollo se produjo a 14 días desde el transplante (ddt), fecha en que comenzaron a aplicarse los tratamientos.

Entre las variables generales, a 6 semanas desde el transplante, la BA no produjo efectos en el número de ramas a cosecha (8,8) ni en el número de flores a cosecha (20,1), que resultaron estadísticamente similares para todas las plantas en ensayo (datos no mostrados). En cambio, se detectó una disminución de la altura de planta con el aumento de la concentración de BA, generándose una tendencia lineal de bajo ajuste, pero muy significativa (Figura 1).

Los tratamientos de BA no afectaron la producción total de materia seca, pero incidieron en su distribución entre los distintos órganos (Tabla 1). En todas las plantas tratadas con BA, a concentraciones crecientes, disminuyó el peso seco de raíces y flores y aumentó el de hojas + tallos. Se establecieron tendencias lineales significativas en todos los casos, y como consecuencia también en las relaciones entre la parte aérea y el total, y, entre las flores y el total aéreo.

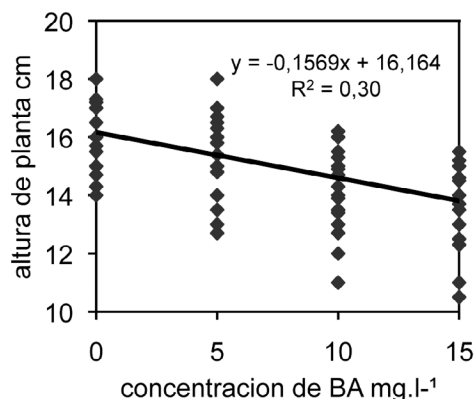


Figura 1. Relaciones entre la altura de planta de petunia a 6 semanas del transplante y concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA). F modelo de regresión < 0,0001
 Figure 1. Relations between the petunia plant height at 6 weeks of the transplant, and concentrations of 6-bencilaminopurine (BA). Regression model, F < 0.0001

Entre las variables foliares, se observaron algunos efectos de los tratamientos (Tabla 2): con el aumento de las concentraciones de BA disminuyó el número total de hojas y aumentaron su largo promedio y su área foliar individual. No se modificaron el área foliar total de las plantas, el ancho promedio de las hojas ni el perímetro promedio de las hojas. En todas las plantas medidas las hojas estaban turgentes y verdes, no detectándose signos de senescencia.

El índice de compacidad definido aumentó con el incremento de concentración de BA (Tabla 2).

La aplicación foliar de BA en petunia modificó la arquitectura de la planta.

Los cambios observados como resultado de las concentraciones crecientes de BA mostraron en todos los casos tendencias lineales, positivas o negativas.

La menor altura de plantas y mayor índice de compacidad registrados con el aumento de la concentración de BA podría resultar de mucho interés agronómico para evitar el uso de reguladores químicos de crecimiento de comprobados efectos residuales en el ambiente (Latimer, 2001; Barrett, 2002).

Tabla 1. Distribución de materia seca a 6 semanas del trasplante, en distintos órganos de plantas de petunia sometidas a tratamientos con 6 bencilaminopurina (BA)

Table 1. Distribution of dry matter at 6 weeks of transplantation, in various organs of petunia plants subjected to treatment with 6 bencilaminopurine (BA)

Concentraciones de BA (mg.l ⁻¹)	Peso seco (g)				Total aéreo: Total (%)	Flores: Total aéreo (%)
	Raíz	Tallos + hojas	Flores	Total		
0	0,576	4,907	1,622	7,105	91,9	24,8
5	0,488	5,098	1,485	7,071	93,1	22,5
10	0,471	5,296	1,370	7,137	93,4	20,6
15	0,467	5,461	1,258	7,186	93,5	18,7
c.v.	9,9	6,1	8,5	5,5	8,9	5,6
P>F*	L = 0,004	L = 0,022	L < 0,001	–	L = 0,007	L < 0,001

* Probabilidad > F de las tendencias significativas (5%) L= lineal, Q= cuadrática o C= cúbica para cada ítem.

Tabla 2. Distintas variables a 6 semanas del trasplante, registradas sobre plantas de petunia sometidas a tratamientos con 6 bencilaminopurina (BA)

Table 2. Variables to 6 weeks of transplantation, associated with petunia plants subjected to treatment with 6 bencilaminopurine (BA)

Concentraciones de BA (mg.l ⁻¹)	Número de hojas	Largo promedio de hoja (cm)	Ancho promedio de hoja (cm)	Perímetro promedio de hoja (cm)	Área foliar promedio de hoja (cm ²)	Área foliar total /planta (cm ²)	Índice de compacidad: peso seco aéreo/altura (g.cm)
0	32,6	4,5	2,0	10,7	6,3	205,4	0,44
5	29,8	4,7	2,1	10,6	6,7	199,7	0,45
10	28,3	4,9	2,2	10,5	7,3	206,6	0,49
15	27,0	5,1	2,2	10,8	7,7	207,9	0,51
c.v.	9,3	7,7	9,8	9,2	12,5	13,6	13,4
P>F*	L = 0,048	L = 0,024	–	–	L = 0,004	–	L = 0,045

* Probabilidad > F de las tendencias significativas (5%) L= lineal, Q= cuadrática o C= cúbica para cada ítem.

Las plantas no difirieron en el área foliar total, pero disminuyó el número de hojas. Los antecedentes reportados por Richmond & Lang (1957) y Badenoch-Jones *et al.* (1996) sobre los efectos de aplicaciones exógenas de citoquininas en la inhibición de la degradación de la clorofila y de las proteínas fotosintéticas, permitirían sugerir que el retardo en la senescencia de las hojas más viejas podría provocar el atraso en el desarrollo de hojas más nuevas.

Las variaciones en el área foliar individual se debieron a cambios en el largo de la hoja, y, posiblemente como consecuencia, se modificó su perímetro. Los efectos de las citoquininas en el tamaño de las hojas fueron observados en distintas especies, comprobándose que existe una mayor concentración de citoquininas en las hojas cuando la fitohormona fue aplicada sobre las mismas, y que las hojas tienen mayor tamaño sólo cuando altas concentraciones de citoquininas se localizan en ellas (Sakurai, 1994).

Con la aplicación de BA no se modificó el número total de flores, pero disminuyó su peso seco y su proporción en el total aéreo (Tabla 1). Nishijima *et al.* (2006) encontraron que la BA aumentó el área de la corola en flores de petunia, pero no comunicaron datos sobre su peso. En nuestro estudio no se hicieron mediciones de tamaño de la corola.

Con la aplicación de BA no se modificó el número de tallos y aunque el número de hojas fue menor, aumentó el peso seco de su conjunto, posiblemente debido a mayor grosor de hojas y/o tallos. Existen antecedentes sobre efectos de la BA en un incremento del parénquima esponjoso y en palizada de las hojas de *Annona glabra* L. (Muniz de Olivera *et al.*, 2008)

La disminución del peso seco de raíces a concentraciones crecientes de BA concuerda con observaciones de otros autores que confirmaron sus efectos sobre la inhibición

en el desarrollo de raíces (Retamales, 2007). Se conoce que las raíces juegan un rol importante en la fisiología de tallos debido posiblemente a la translocación de citoquininas entre aquellas y éstos (Sitton *et al.*, 1967). Se ha demostrado que la aplicación exógena de BA a las hojas compensa plenamente la acumulación de la fitohormona en plantas con raíces total o parcialmente escindidas (Carmi & Koller, 1978). Carmi & Staden (1983), por su parte, encontraron que los tallos pueden ser una fuente alternativa de citoquininas para las hojas.

El mayor conocimiento de los aspectos básicos de regulación que ejerce BA en especies florales, permitirá avances en el incremento de la productividad y de la calidad en diversos cultivos ornamentales.

Conclusiones

Se detectaron cambios en la arquitectura vegetal relacionados con la aplicación de concentraciones crecientes de BA en plantas de petunia.

Particularmente, la disminución de la altura y el aumento de la compacidad pueden destacarse como los resultados de mayor valor agronómico.

Deberían explorarse en futuros ensayos la incidencia de estos tratamientos en otros parámetros de interés como el color y tamaño de las flores y el color las de hojas.

Referencias bibliográficas

Badenoch-Jones J, Parker CW, Letham DS and Singh S, 1996. Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. *Plant Cell Environ* 19: 504-516.

- Barrett, J. 2002. Chemical growth regulator chart. Tips on managing floriculture crop problems; pest, diseases, and growth control. p. 103-115. Ohio Florists Assoc. Serv. Inc., Columbus, Ohio, USA.
- Carmi A and Koller D, 1978. Effects of the roots on the rate of photosynthesis in primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Photosynthetica* 12: 178-184.
- Carmi A and van Staden J, 1983. Role of roots in regulating the growth rate and cytokinin content of leaves. *Plant Physiology* 73, 76-78.
- Divo de Sesar M, 2005. Integración de estudios fisiológicos, histológicos y bioquímicos realizados durante el enraizamiento, rusticación y crecimiento posterior de especies de interés agronómico suplementadas con citoquininas. Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, 222 pp.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H and Sakakibara H, 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.*, 59: 75 - 83.
- Kamisaka S and Miyamoto K, 1994. Physiology of gibberellins in plant growth and development. In: N. Takahashi and Y. Masuda, Editors, *Handbook of Plant Hormones*, Baifukan Co. Ltd., Tokyo pp. 82-148.
- Kessler Jr JR, 1998. Greenhouse production of petunia. Alabama Cooperative Extension System, Auburn University, Alabama, USA. ANR-1118. Disponible en: <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1118/> (Acceso 10 Noviembre 2008).
- Latimer JG, 2001. Selecting and using plant growth regulators on floricultural crops. 21 p. Virginia Cooperative Extension, Publication 430-102. Virginia State University, Petersburg, Virginia, USA.
- Letham DS, 1969. Cytokinins and their relation to other phytohormones, *Bioscience* 19: 309-316.
- Muniz de Olivera L, Paiva R, Aloufa MAI, de Castro EM, Ferreira de Santana JR and Nogueira RC, 2008. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo in vitro e ex vitro. *Cienc. Rural* 38 (5): 1447-1451.
- Nishijima T, Miyaki H Sasaki K and Okazawa T, 2006. Cultivar and anatomical analysis of corolla enlargement of petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) by cytokinin application. *Sc. Hort.* 111 (1): 49-55.
- Retamales, J. 2007. Hormonas Vegetales y Reguladores de Crecimiento: Aspectos básicos y modos de acción. Taller de Reguladores de Crecimiento y Bioestimulantes en Cultivos Extensivos. Mar del Plata, Argentina, 29 de junio. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/actividad/capacitalagron2007/regulcrecl/RetamalesGraficaColor.pdf> (Acceso 30 Octubre 2009).
- Richmond AE and Lang A, 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* 125: 650-651.
- Sakurai N, 1994. Physiology of cytokinins. In: N. Takahashi and Y. Masuda, Editors, *Handbook of Plant Hormones*, Baifukan Co. Ltd., Tokyo, pp. 580-614.
- SAS Institute, 1989. *SAS/STAT User's guide*. Version 6. 4th ed. Vol. 2. 8846 pp. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Sitton D, Itai C and Kende H, 1967. Cytokinin production as a factor in shoot senescence. *Planta* 73: 296-300.
- Taverner E, Letham DS, Wang J, Cornish E and Willcocks DA, 1999. Influence of ethylene on cytokinin metabolism in relation to *Petunia* corolla senescence. *Phytochemistry* 51: 341-347.
- Tsui C, Tao G, Chen H, Son Y, Lian H, Tong Z, Li S and Li X, 1980. Effect of cytokinins on the expansion and metabolism of excised cucumber cotyledons, *Austral. J. Plant Physiol.* 7: 227-236.

(Aceptado para publicación el 17 de enero de 2010)

Estudio de nutrientes lixiviados bajo cultivo de alstroemeria por aporte de estiércoles de porcino en un suelo arenoso

R. Miralles de Imperial*, J.V. Martín*, R. Calvo**, M.M. Delgado*

* INIA. Dpto. de Medio Ambiente (miralles@inia.es)

** INIA. Servicio de Biometría. Ctra. de La Coruña km. 7,5. 28040 Madrid

Resumen

Se condujo un ensayo en invernadero y macetas con alstroemeria (*Alstroemeria aurantiaca* D. Don) cultivar 'Napoli'. Se aplicaron como fertilizantes dos tipos de purín: purín fresco y purín secado térmico. El objetivo fue estudiar el posible efecto contaminante, por la lixiviación de nutrientes de los dos purines. Las dosis de purín estudiadas fueron 0 (sin fertilización), 1 (que cubría las necesidades en nitrógeno del cultivo) y 2 (el doble de 1). Se realizaron cuatro lixiviados por maceta, en primavera, verano, otoño e invierno. La concentración de nutrientes por maceta en el lixiviado dependió del volumen de agua lixiviada. Las variables que se evaluaron en los lixiviados fueron: N-NH_4^+ , N-NO_3^- , fósforo y potasio. La metodología seguida para ajustar estima y comparar los modelos fue la del modelo mixto no lineal. Los tratamientos purín fresco y purín secado térmico y las dosis (1 y 2) fueron significativamente diferentes. El tratamiento purín secado térmico y la dosis 2 resultaron los más contaminantes para las cuatro variables estudiadas.

Palabras clave: fósforo, N-NH_4^+ , N-NO_3^- , potasio, purín fresco, purín secado térmico.

Summary

Leaching of nutrients from Alstroemeria cultures on sandy soils fertilized with pig manure

An experiment was conducted in Alstroemeria (*Alstroemeria aurantiaca* D. Don, cultivar 'Napoli') cultured in pots under greenhouse conditions. Two different types of pig slurry, pig slurry and thermal dried pig slurry, were applied as fertilizer. The aim was to evaluate the possible effect on pollution of leaching nutrients of the two pig slurries. Rates studied were 0 (without fertilization), 1 (the rate 1 that covered the nitrogen culture requirement) and 2 (the double of rate 1). The nutrients concentration of the leaching depended of the volume of leached water. Four leachings by pot were made at spring, summer, autumn and winter. The $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, phosphorus and potassium, variables were studied. The methodology to adjust estimation and to compare the models was the nonlinear mixed model. Treatments (pig slurry and thermal dried pig slurry, and the two rates, 1 and 2) were significantly different. The thermal dried pig slurry treatment and the rate 2 treatment were the most polluting in the four studied variables.

Key words: $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, phosphorus, pig slurry, potassium, thermal dried pig slurry.

Introducción

Los purines de ganado contienen cantidades de nutrientes nitrógeno, fósforo y potasio fácilmente disponibles para las plantas; pero su utilización en agricultura debe hacerse de manera controlada para evitar efectos negativos en el aire, el suelo y el agua (Scotford et al., 1998).

El suelo constituye uno de los medios receptores de la contaminación más sensibles y vulnerables (BOE, 2005a). La aparición de nuevos productos que contienen nutrientes para las plantas y capacidad fertilizante no debe ser óbice para que se olviden sus posibles repercusiones en la salud y seguridad de las personas y del medio ambiente (BOE, 2005b).

La ley 16/2002, de 1 de julio, de Prevención y Control Integrados de la Contaminación, que traspuso la Directiva 96/61/CEE (IPPC), incluye en su ámbito de actuación la cría intensiva de ganado porcino. Se considera el medio ambiente como un todo y se debe evitar la transferencia de contaminación de un medio (agua, suelo y atmósfera) a otro (BOE, 2002).

Las explotaciones intensivas de ganado porcino generan gran cantidad de estiércol líquido o purín fresco (PF) cuyo manejo es complicado. Actualmente en España se evapora y seca parte de este estiércol líquido, aplicando tecnologías para el secado térmico del purín basadas en la cogeneración energética para eliminar el agua que contienen. El producto final se conoce como purín secado térmico (PS), un producto concentrado, que puede ser usado como fertilizante.

Desde el punto de vista de su utilización agronómica, es necesario conocer su composición y establecer las necesidades del suelo y del cultivo, de modo que se pueda optimizar su uso respetando a la vez el medioambiente.

El cultivo en invernadero de alstroemeria para flor cortada se adapta a la climatología

de la zona centro de España. Para conseguir una buena producción y calidad en el cultivo de alstroemeria es fundamental aplicar una fertilización órgano-mineral óptima que cubra sus necesidades de elementos nutritivos: N-P-K, (Miralles de Imperial et al., 2005). La utilización como fertilizante de estiércoles de ganado porcino en este cultivo ornamental puede resultar una vía óptima para el reciclado y reutilización de estos residuos ganaderos.

La protección de las aguas frente a la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias viene recogida en la legislación española por el Real Decreto 261/1996 (BOE, 1996). Varios autores han realizado estudios referentes al control de nitrógeno (Bellido et al., 1997; Vasconcelos et al., 1997; Daudén y Quilez, 2004; Daudén et al., 2004; Bergström et al., 2006), de fósforo (Bergström et al., 2006) y de potasio (Yavinder et al., 2005), en lixiviados por aplicación de purines de cerdo.

El objetivo del presente ensayo fue evaluar el posible riesgo contaminante por nutrientes en las aguas de drenaje por la aplicación como fertilizante de estiércoles de ganado porcino: purín fresco (PF) y purín secado térmico (PS) a un cultivo de alstroemeria (*Alstroemeria aurantiaca* D. Don) cultivar (cv.) 'Nápoli', para flor cortada, y comparar el efecto de estos estiércoles en los nutrientes lixiviados, mediante el control de cuatro parámetros: $N-NH_4^+$ (NH_4^+), $N-NO_3^-$ (NO_3^-), fósforo (P) y potasio (K).

Materiales y métodos

El ensayo en invernadero se llevó a cabo en Madrid, durante 13 meses, de febrero de 2003 a marzo de 2004. Se utilizó un cultivar nuevo, 'Nápoli' (NA), de flores color fucsia oscuro, tolerantes a las condiciones climáticas de calor y frío de la zona. Se utilizaron

macetas de arcilla con drenaje, de 12 L de capacidad que se rellenaron con un suelo de pH 6,87 idóneo para este cultivo y que por su textura franco arenosa le proporcionará un buen drenaje; sus propiedades se presentan en la tabla 1.

Las macetas se rellenaron con el suelo, que previamente se mezcló con la dosis anual de fertilizante PS o PF. En este experimento se emplearon dos purines, PF y PS, provenientes de la misma planta de tratamiento de estiércoles líquidos ganaderos porcinos. El

Tabla 1. Características del suelo
Table 1. Soil characteristics

Parámetro	
pH 1:2,5 H ₂ O	6,87
Conductividad eléctrica 1:5 H ₂ O, dSm ⁻¹	0,09
Nitrógeno Kjeldahl, %	0,045
Carbono orgánico oxidable, %	0,33
N-NH ₄ ⁺ , mg kg ⁻¹	1,86
N-NO ₃ ⁻ , mg kg ⁻¹	14,55
Fósforo (Olsen), mg kg ⁻¹	12,0
Potasio (acetato amónico), mg kg ⁻¹	2,61
Textura del suelo	
Arena gruesa, %	12,23
Arena fina, %	51,29
Suma arenas (gruesa + fina), %	63,52
Arcilla, %	0,2
Limo, %	36,28
Textura MAPA*	Franco-arenoso

* MAPA= Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, (1994).

PF era purín sin tratar y PS fue ya tratado térmicamente.

Las características de los purines utilizados en el experimento se presentan en la tabla 2. El nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl. El nitrógeno inorgánico se determinó por destilación de arrastre de vapor (Bremmer, 1965).

El carbono orgánico oxidable se determinó por el método de Walkey y Black (APHA, AWWA, WPCF, 1992). El P, K, Ca, Mg, y Na

totales se midieron por los procedimientos descritos por la AOAC (1997). Se determinaron pH suelo/agua= 1:2,5 y conductividad eléctrica en una relación suelo/agua= 1:5. El pH y la C.E. de PF se determinaron directamente sobre la muestra y para PS en una relación PS/agua= 1:5.

Se determinó del PF la demanda química de oxígeno (APHA, AWWA, WPCF, 1992) para conocer su contenido en materia orgánica y del PS se determinó el contenido de C orgá-

Tabla 2. Características de los purines de cerdo
 Table 2. Pig slurry characteristics

Parámetro	Purín fresco	Purín secado térmico
pH	7,27	9,14
C.E.*, dSm ⁻¹	19,72	33,97
DQO**, mg L ⁻¹	83263	–
Sólidos totales, %	7,30	81,50
Sólidos fijos, %	2,22	28,06
Sólidos volátiles, %	5,08	53,44
N Kjeldahl, mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	2022	21583
N-NH ₄ ⁺ , mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	1451	242
N-NO ₃ ⁻ , mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	82	759
C orgánico oxidable, %	–	36,22
P mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	1816	16802
K mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	972	8995
Ca mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	2147	31229,5
Mg mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	926	11348,5
Na mg L ⁻¹ , mg kg ⁻¹	1010	22783,5

*C.E. = conductividad eléctrica; **DQO = demanda química de oxígeno.

nico oxidable. Se determinaron los sólidos totales, los sólidos fijos y los sólidos volátiles en PF y PS (APHA, AWWA, WPCF, 1992).

Para el cálculo de la dosis de PF y PS a aplicar al cultivo, se tuvieron en cuenta las necesidades de nitrógeno (N) anual de este cultivo, se aconsejan dosis anuales de nitrógeno de 350 Kg ha⁻¹ (Miralles de Imperial et al., 2005). Para el cálculo de la dosis anual de cada tipo de purín, PF y PS, a aplicar para cubrir las necesidades de N de la alstroemeria se tuvo en cuenta: el N Kjeldahl que engloba el N orgánico más el N amoniacal al que se sumó el contenido en N nítrico, esta suma nos indicó el N total que se aporta con PF o con PS. En el caso de PF la dosis que cubría dichas necesidades, fue de 100 m³ ha⁻¹ y en el caso de PS fue de 15.708 kg ha⁻¹ (para su calculo en kg ha⁻¹ se consideró la densidad aparente

del suelo de 1,1 y una profundidad de 30 cm), esta dosis se llamó 1 (d1).

El material adicionado a los 12 kg de suelo de cada maceta fue para PF de 0 mL con la dosis 0, 364 mL con la dosis 1 y 728 mL con la dosis 2; para PS fue de 0 g para d0, 57,12 g para d1 y 114,68 g para d2.

Las cantidades de elementos nutritivos: N-P-K, que se aportaron por maceta, según el contenido en N-P-K de estos residuos que se presentan en la tabla 2, figuran en la tabla 3.

La plantación de alstroemeria se realizó en febrero y se puso un rizoma por maceta. El diseño del ensayo fue totalmente al azar, factorial de doble entrada (tipo de purín, dosis) con tres repeticiones por tipo de purín y dosis. Las tres dosis aplicadas fueron: d0 (sin fertilización), d1 (que cubría las necesidades en N del cultivo) y d2 (el doble

Tabla 3. Cantidad de elementos nutritivos, N-P-K, aportados por maceta con los tratamientos: purín fresco (PF) y purín secado térmico (PS) y las dosis (0, 1 y 2)

Table 3. N-P-K, nutrients applied by pot with the treatments: pig slurry (PF) and dried thermal pig slurry (PS) and the rates (0, 1 and 2)

Tratamiento	Dosis	Nitrógeno* mg N maceta ⁻¹	Fósforo mg P maceta ⁻¹	Potasio mg K maceta ⁻¹
PF	0	0	0	0
PF	1	1290	660	354
PF	2	2580	1350	708
PS	0	0	0	0
PS	1	1290	960	514
PS	2	2580	1927	1030

*Nitrógeno= suma de N orgánico, N amoniacal y N nítrico.

Tabla 4. Número de tallos florales (TF) de alstroemeria cv. 'Napoli' producidos en función del tratamiento: purín fresco (PF) y purín secado térmico (PS) y las dosis (0, 1 y 2) en los periodos de primavera-verano y de otoño-invierno, y producción anual de TF

Table 4. *Alstroemeria* cv. 'Napoli' floral stems number (TF) production regarding to the treatment: pig slurry (PF) and dried thermal pig slurry (PS) and the rates (0, 1 and 2) in the spring-summer and autumn-winter periods, and TF total production

Tratamiento	Dosis	Primavera-verano TF	Otoño-invierno TF	Producción anual TF
PF	0	5	0	5
PF	1	6	0	6
PF	2	6	1	7
PS	0	4	1	5
PS	1	4	4	8
PS	2	6	7	13

de d1). El número total de macetas utilizados para el ensayo fue dieciocho, nueve por cada tratamiento: PF y PS.

Los macetas de arcilla tenían un único agujero de drenaje que se tapó con un filtro para evitar pérdidas de suelo y agua. Las macetas iban colocadas sobre soportes metálicos, que las elevaban 17 cm sobre la superficie de las mesas del invernadero. Los

días que se procedió a recoger los lixiviados se colocaron justo por debajo del agujero de drenaje de los macetas un frasco graduado de 500 mL de capacidad y encima un embudo que se ajustó al agujero de drenaje de la maceta.

Se realizaron cuatro lixiviados a lo largo de este primer año de cultivo, uno en cada estación del año: en primavera, verano,

otoño e invierno. Se optó por estas fechas porque la producción de tallos florales en cultivo de alstroemeria está muy influenciada por la estación del año debido a factores de luz, humedad, temperatura del aire y del suelo (Miralles de Imperial et al., 2009). El primer lixiviado (1º) se realizó el 24 de marzo de 2003 (al mes de la plantación), se consideró día 0. El segundo a los 129 días (el 30 de julio), el tercero a los 193 días (el 2 de octubre) y el cuarto y último el 3 de marzo de 2004 a los 346 días.

Se calculó la capacidad de campo (CC) del suelo y se obtuvo que para los 12 kg eran 800 mL (100% CC). Mientras duró el ensayo se regó cada maceta al 60% de su CC, según las necesidades del cultivo. Para provocar cada uno de los lixiviados se regó la maceta con un volumen de agua superior al 150% de la CC de nuestro suelo y se recogieron de 250 a 500 mL de lixiviado. Para el cálculo posterior de la concentración de los nutrientes lixiviados: NH_4^+ , NO_3^- , P y K, se tuvo en cuenta los mL de lixiviado recogidos por maceta en cada uno de los cuatro lixiviados realizados de las cuatro estaciones del año.

En los lixiviados se determinaron: NH_4^+ , NO_3^- , P y K. El NH_4^+ y NO_3^- se analizaron por el método de Bremner (1965). El fósforo de los lixiviados se determinó por fotometría de emisión y el potasio de los mismos por fotometría de llama (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 1994).

El estudio estadístico se realizó mediante ajuste con modelo logístico, se tomaron como variables dependientes: las cantidades acumuladas de N- NH_4^+ , N- NO_3^- , P y K lixiviados, y como variable independiente los días.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en este ensayo se tuvo en cuenta que los cuatro lixiviados se realizaron en la misma maceta por lo que tuvimos un diseño de medidas repetidas y como nuestros datos se ajustaban a un modelo logístico se eligió

la metodología del modelo mixto no lineal para estimar los modelos y la comparación entre ellos. Para el estudio de los efectos fijos (tratamiento, dosis) se comenzó con el modelo saturado que incluye los efectos principales (tratamiento y dosis e interacción entre ellos) en cada uno de los tres parámetros de la logística: b_1 , b_2 y b_3 . También se añadieron al principio dos efectos aleatorios (u, v) que se sumaron a los parámetros b_1 y b_2 en todos los casos. El segundo efecto aleatorio (v) sumado a b_2 no dio nunca significativo por lo que no se refleja en el modelo general que fue:

$$y_{ijk} = [b_{1ijk} / (1 + \exp(-(\text{días} - b_{2ij}) / b_{3ij}))] + e_{ijk}$$

Donde: b_{1ijk} ($b_{1ijk} = b_{1ij} + u_k$) es la asíntota, b_{2ij} esta relacionado con la velocidad de lixiviación, b_{3ij} es el parámetro relacionado con la forma de la curva, la i son los tratamientos PF y PS, la j son las dosis 1 y 2, la k es cada una de las 18 macetas, u_k = factor aleatorio que va unido a cada una de las macetas, $u_k \sim N(0, \sigma_u)$, e_{ijk} = error aleatorio, $e_{ijk} \sim N(0, \sigma_e)$. Al parámetro b_{1ij} le llamaremos b_1 del tratamiento i y la dosis j, al b_{2ij} (b_2) y al b_{3ij} (b_3).

El análisis estadístico se realizó con el PROCEDURE NL MIXED del SAS V 9.3.

Resultados y discusión

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se presentan las gráficas de los modelos para las cuatro variables estudiadas (NH_4^+ , NO_3^- , P y K).

El N presente en el purín procede de la parte de N contenida en los alimentos, que no es fijada por los animales, eliminándose por heces y orina. Dos terceras partes del N ingerido en el pienso son eliminadas por las deyecciones, del N eliminado el 78% es N urinario y el 22% de origen fecal (Abaigar et al., 1999). El N está presente en la fracción líquida y sólida de los purines, una

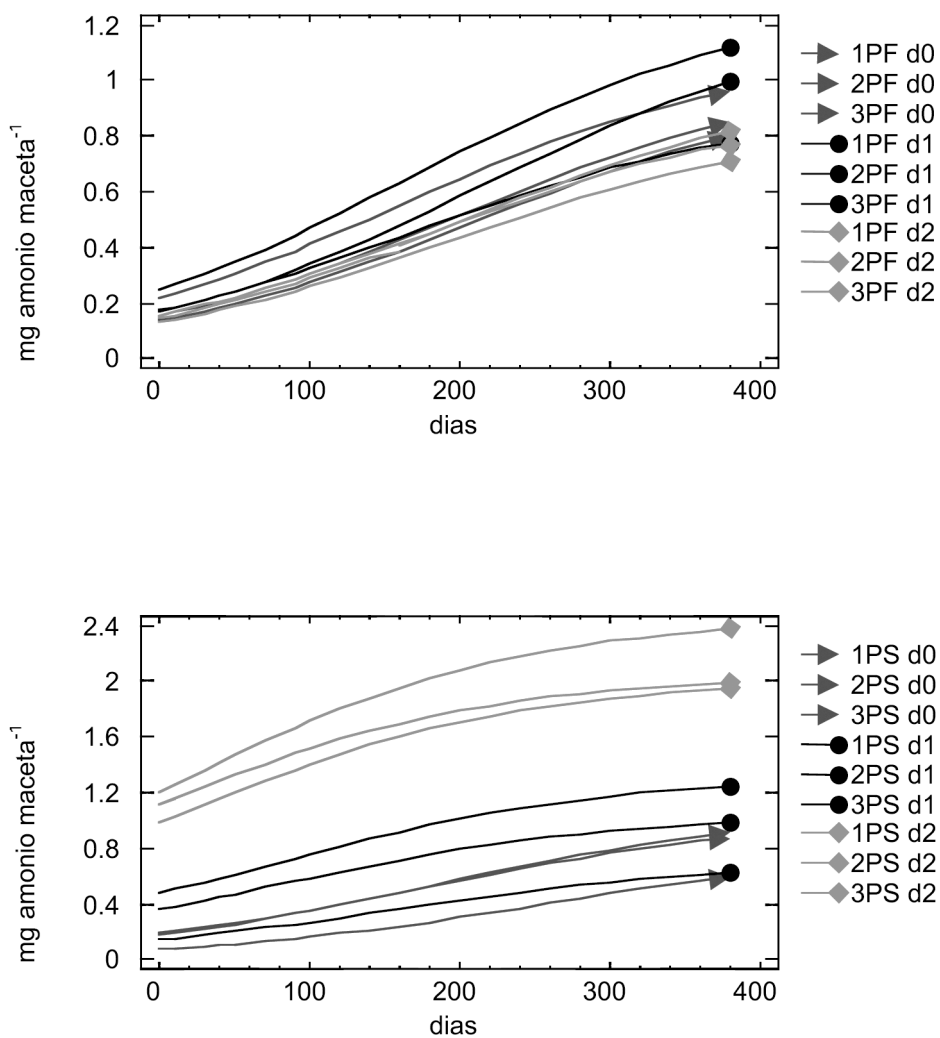


Figura 1. Gráficas de los modelos estimados obtenidas para N-NH_4^+ lixiviado acumulado. Según tratamiento: purín fresco (PF) y purín secado térmico (PS) para las dosis (d): 0, 1 y 2
 Figure 1. Estimated models graphs obtained for accumulated leached $\text{NH}_4^+\text{-N}$. According to the treatment: pig slurry (PF) and thermal dried pig slurry (PS) for the rates (d): 0, 1 and 2

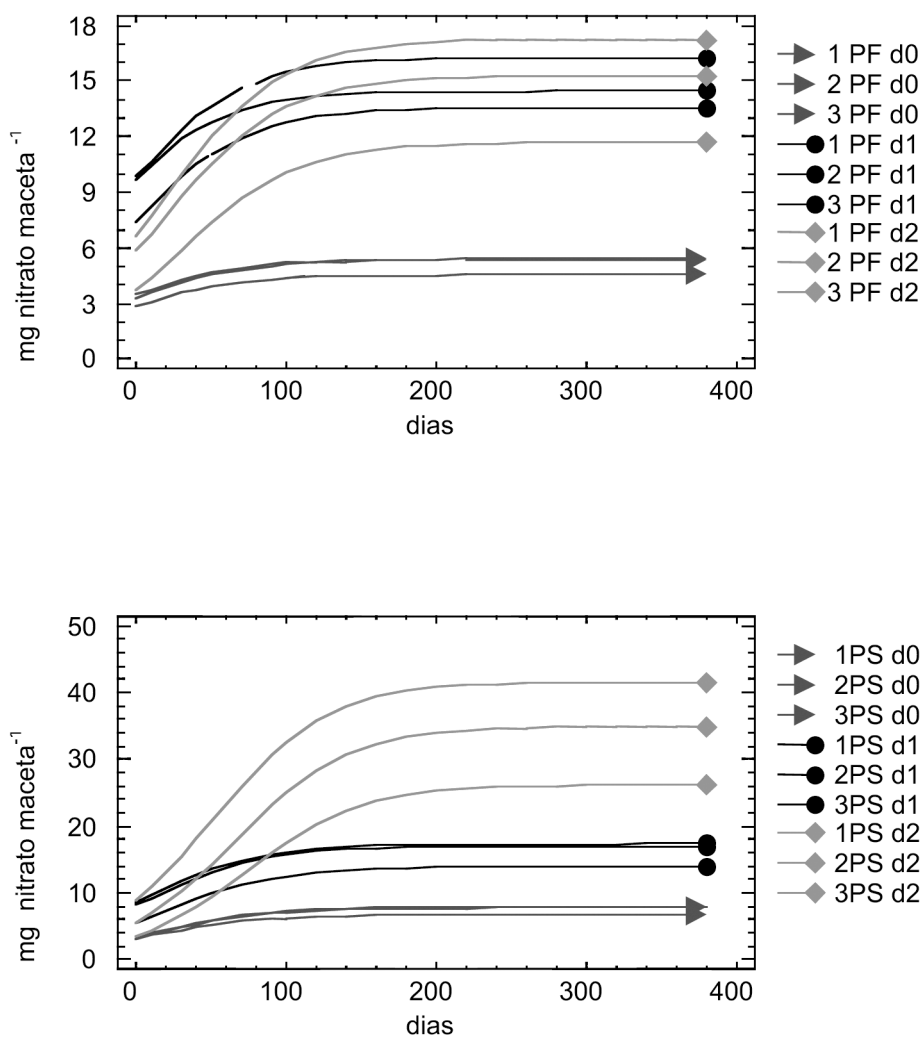


Figura 2. Gráficas de los modelos estimados obtenidas para $N-NO_3^-$ lixiviado acumulado. Según tratamiento: purín fresco (PF) y purín secado térmico (PS) para las dosis (d): 0, 1 y 2
 Figure 2. Estimated models graphs obtained for accumulated leached NO_3^- -N. According to the treatment: pig slurry (PF) and thermal dried pig slurry (PS) for the rates (d): 0, 1 and 2

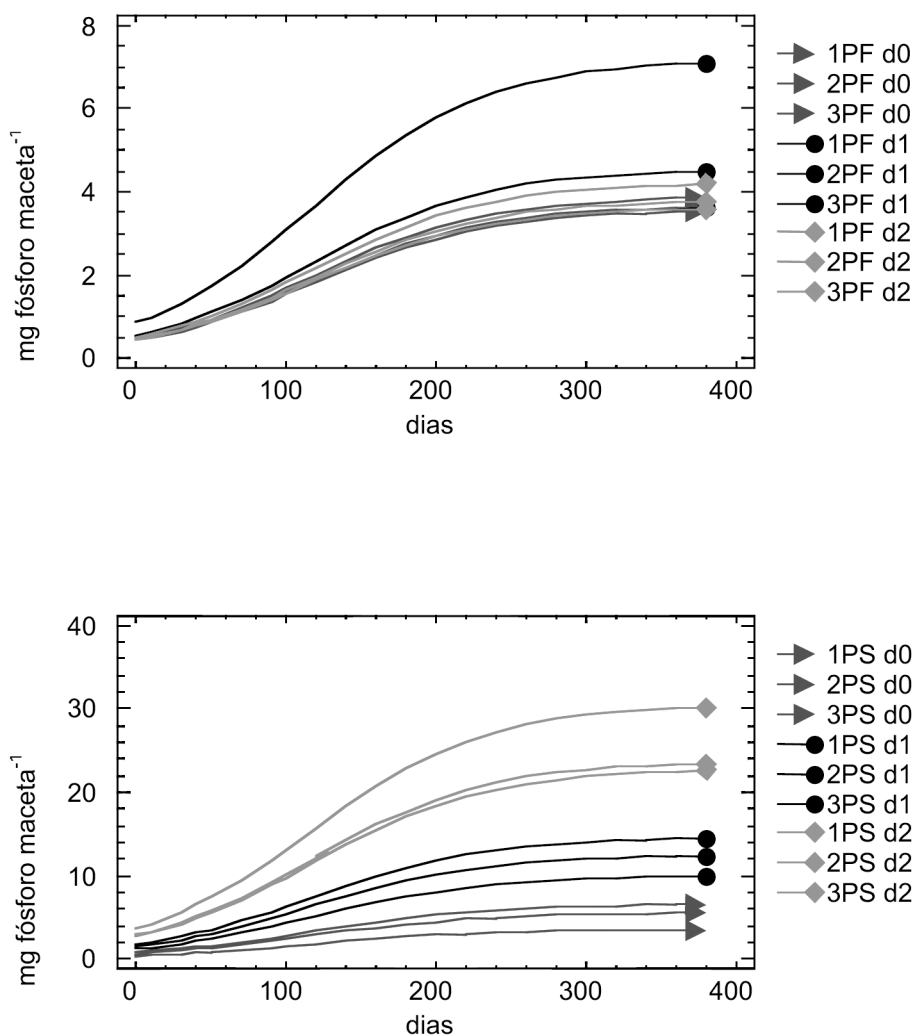


Figura 3. Gráficas de los modelos estimados obtenidas para fósforo lixiviado acumulado. Según tratamiento: purín fresco (PF) y purín secado térmico (PS) para las dosis (d): 0, 1 y 2
 Figure 3. Estimated models graphs obtained for accumulated leached phosphorus. According to the treatment: pig slurry (PF) and thermal dried pig slurry (PS) for the rates (d): 0, 1 and 2

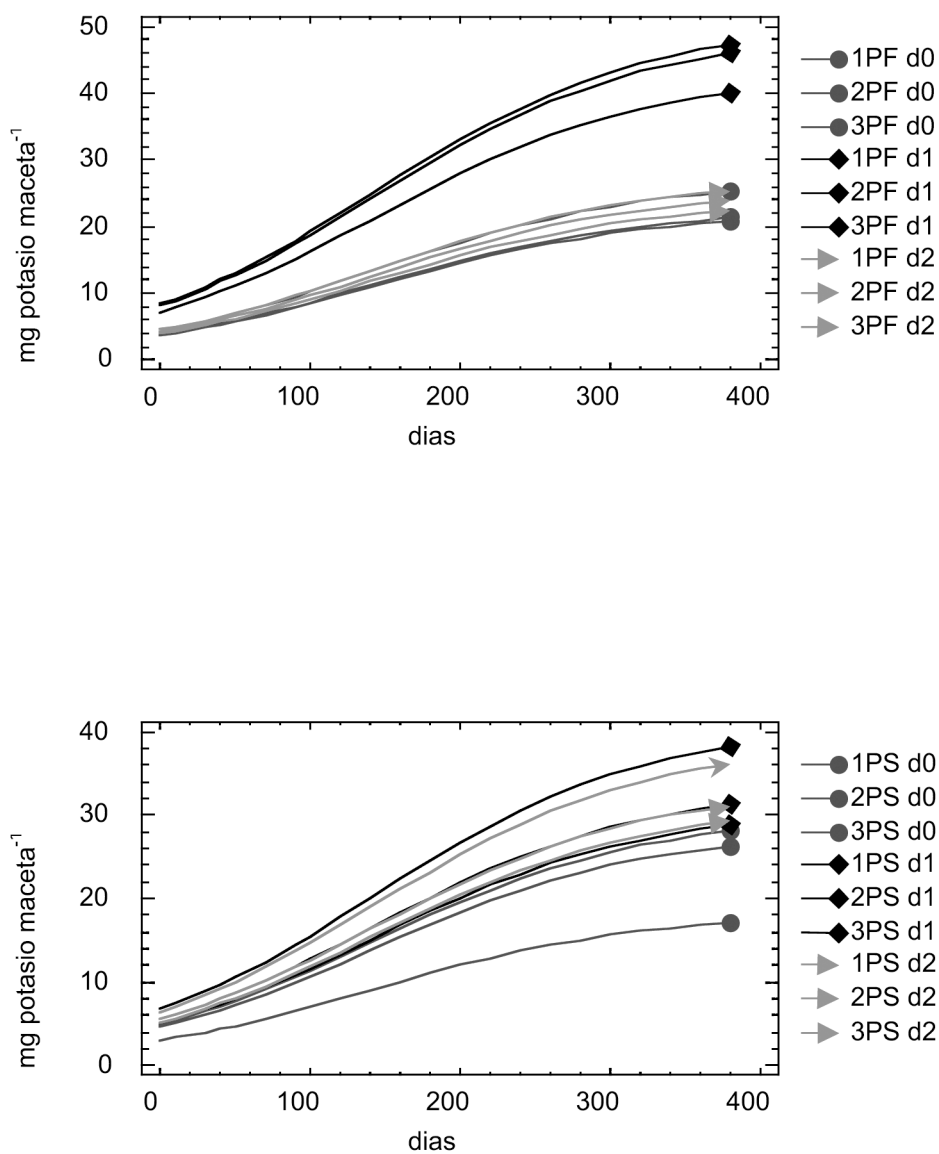


Figura 4. Gráficas de los modelos estimados para potasio lixiviado acumulado. Según tratamiento: purín fresco (PF) y purín secado térmico (PS) para las dosis (d): 0, 1 y 2
 Figure 4. Estimated models graphs obtained for accumulated leached potassium. According to the treatment: pig slurry (PF) and thermal dried pig slurry (PS) for the rates (d): 0, 1 and 2

parte en forma mineral constituida casi completamente por NH_4^+ y otra parte en forma orgánica que debe ser mineralizada para ser utilizada por los vegetales.

En los modelos estimados para NH_4^+ acumulado (figura 1) de los lixiviados, para las dosis 1 y 2 con PF no hubo diferencias significativas en los parámetros b_1 ($p=0,455$) y b_2 ($p=0,612$) pero si fue significativo para b_3 ($p=0,046$). Para PS los modelos para d1 y d2 fueron diferentes significativamente en el contenido final de NH_4^+ acumulado b_1 ($p<0,001$), que es la asíntota, pero para b_2 y b_3 no hubo diferencias significativas. Los bajos contenidos obtenidos de NH_4^+ acumulado frente a los de NO_3^- acumulado como podemos observar en las figuras 1 y 2 se pueden explicar por la rápida transformación del amonio del purín a nitrato (Daudén et al., 2004).

Los modelos estimados para NO_3^- acumulado (figura 2) de los lixiviados, para d1 y d2 con PF fueron diferentes significativamente para b_2 ($p<0,0001$) y b_3 ($p=0,02$) y no para b_1 ($p=0,9652$), lo que nos indica que en el contenido final de NO_3^- acumulado no existen diferencias aunque aumentáramos las dosis, pero si en la velocidad de lixiviación del nitrato. El hecho de que inicialmente sea más alta la velocidad de lixiviación para PF d1 que para PF d2 a pesar de que la cantidad de N aplicada con d2 sea mayor, pudo ser debido a que la tasa de mineralización del N depende del N orgánico y del tiempo transcurrido. La máxima tasa de mineralización se produce en las primeras semanas de aplicación al suelo y al ser alta la cantidad de N aportada con d2, la actividad microbiana y enzimática del suelo se pudo ralentizar (Martín et al., 2009).

Los modelos estimados para NO_3^- acumulado (figura 2) con el tratamiento PS para d1 y d2 fueron diferentes significativamente en los tres parámetros de la logística con probabilidades para b_1 ($p<0,0001$), b_2 ($p<0,001$) y b_3 ($p=0,0261$). Esto significa que con PS

hubo diferencias entre d1 y d2 tanto en el NO_3^- acumulado (b_1), como en la velocidad en que se produjo el lixiviado (b_3 y b_2). En nuestro ensayo como podemos observar en la figura 2, la dosis 2 al tener mayor cantidad de NO_3^- que la dosis 1 lixivia más NO_3^- .

El fósforo de las deyecciones animales está contenido esencialmente en las partes sólidas de las heces y se presenta bajo dos formas: el 80% en forma mineral, fácilmente utilizable por las plantas y el 20% restante en forma orgánica, que será mineralizado lentamente en el suelo (Abaigar et al., 1999).

En los modelos estimados para P acumulado (figura 3) no existieron diferencias significativas entre las dosis con PF para ningún parámetro: b_1 ($p=0,50$), b_2 ($p=0,49$) y b_3 ($p=0,34$) y para PS fueron muy diferentes los modelos para d1 y d2 en el contenido final de P acumulado reflejado por b_1 ($p<0,0001$) aunque no hubo diferencias significativas para los otros dos parámetros: b_2 ($p=0,496$) y b_3 ($p=0,3455$). En el presente ensayo si se lixivia más fósforo en PS que en PF es porque el fósforo está en la parte sólida del purín y además con PF se aplica menos fósforo que con PS ya que las concentraciones en este último son mucho más elevadas, como se puede ver en la tabla 2.

El potasio contenido en las deyecciones animales es casi exclusivamente urinario y está presente en forma de sales minerales solubles (Abaigar et al., 1999).

En los modelos estimados para K acumulado (figura 4) no existieron diferencias significativas para PS entre dosis y si hubo para PF en el contenido final de K acumulado b_1 ($p<0,0001$), que es la asíntota. El potasio de PF es casi exclusivamente urinario, lo que explicaría que en nuestro ensayo inicialmente se lave más K con PF.

A la vista de los resultados obtenidos se deben ajustar las dosis de fertilización a las necesidades de nutrientes del cultivo no

sólo del nitrógeno sino también de fósforo y potasio (Daudén et al., 2004; Abaigar et al., 1999). Al ajustar la dosis a los tres nutrientes N-P-K se evitará un posible exceso de éstos que podría contaminar las aguas subterráneas (BOE, 1996).

En nuestro ensayo al ser el primer año de cultivo, de entrada en producción, la planta de alstroemeria produjo pocos tallos florales (TF), con una producción total anual de 18 tallos para el tratamiento PF y de 26 tallos para el tratamiento PS. En la tabla 3 se presenta la producción de TF (suma de las tres repeticiones, que corresponden a los tres macetas de cada tratamiento y dosis) en los periodos de primavera verano y otoño invierno y la producción anual de TF este primer año de cultivo en el que se realizaron los lixiviados. El presente ensayo refleja que aunque la d2 aumenta el número de TF (principalmente con PS), la d1 es también buena y además produce en general menores pérdidas por lixiviación de nutrientes.

Conclusiones

Se calculó el porcentaje (%) de pérdida de nutrientes por lixiviación, N-P-K, respecto a las cantidades de N-P-K adicionadas inicialmente con PF y PS en las dosis d1 y d2 (descontada d0).

En el caso del nitrógeno (suma de las pérdidas de N-NH_4^+ y N-NO_3^-) el % de pérdida de N fue con PF d1 de 0,75% y con PS d1 de 0,66%; con PF d2 de 0,37% y con PS d2 de 1,09%. Para el fósforo, el % de pérdida de P fue con PF d1 de 0,2%, y con PS d1 de 0%, con PF d2 de 0% y con PS d2 de 1,18%. Para el potasio, el % de pérdida de K fue con PF d1 de 2,1% y con PS d1 de 1,75%, con PF d2 de 0% y con PS d2 de 0,81%. Los mayores porcentajes de pérdida de nutrientes respecto a las cantidades de N-P-K aportadas

por maceta con PF y PS, se produjeron para N y P con d2 y PS. Para K fue con PF.

Este ensayo constató la importancia que tiene el establecer para cada cultivo un correcto plan de fertilización en N-P-K con estos purines de porcino, con el fin de evitar o reducir los riesgos de contaminación por nutrientes lixiviados.

Bibliografía

- Abaigar A, Iñigo JA, Irañeta I, Pérez de Ciriza JJ, Santos A, Amézqueta J., Carro P, Zuazu P, 1999. Purines de porcino (II) Producción, composición y medioambiental. *Navarra Agraria*, 116: 38-48.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemist), 1997. Official Methods of Analysis (Cunniff, Ed.) 16 th edition. Vol II, Garthersburg, Maryland.
- APHA, AWWA, WPCF, 1992. Standard methods for the examination of water and waste. American Public Health Association. New York. 874 p.
- Bellido N, Porcel MA, Delgado MM, Miralles de Imperial R, Bigeriego M, 1997. Avances en la utilización agrícola de purines de cerdo. Estudio sobre la reutilización en agricultura de residuos de ganado porcino. Cultivo de maíz y análisis de lixiviados. *Porci*, 41: 59-65.
- Bergström L, Kirchmann H, 2006. Leaching and crop uptake of nitrogen and phosphorus from pig slurry as affected by different application rates. *Journal of Environmental Quality*, 35: 1803-1811.
- BOE, 1996. Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias. *Boletín Oficial del Estado*, 61: 9734-9737.
- BOE, 2002. Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación. *Boletín Oficial del Estado*, 157: 23910- 23927.

- BOE, 2005a. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. *Boletín Oficial del Estado*, 15: 1833-1843.
- BOE, 2005b. Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. *Boletín Oficial del Estado*, 171: 25592-25669.
- Bremner JM, Edwards AP, 1965. Determination and isotope- ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: I. Apparatus and procedure for distillation and determination of ammonium. *Soil Science Society of America Proceedings*, 504-507.
- Daudén A, Quílez D, 2004. Pig slurry versus mineral fertilization on corn yield and nitrate leaching in a Mediterranean irrigated environment. *European Journal of Agronomy*, 21: 7-19.
- Daudén A, Quílez D, Vera MV, 2004. Pig slurry application and irrigation effects on nitrate leaching in Mediterranean soil lysimeters. *Journal of Environmental Quality*, 33(6): 2290-2295.
- Martín JV, Miralles de Imperial R, Delgado MM, 2009. Mineralización del nitrógeno en diferentes estiércoles de granjas avícolas. *Vida Rural*, 294: 54-58.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994. Métodos Oficiales de Análisis. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. Tomo III. 662 p.
- Miralles de Imperial R, Beltrán EM, Porcel MA, Beringola ML, Martín JV, Delgado MM, 2005. Aplicación de estiércol de ganado porcino. Efectos sobre la calidad y producción en alstroemeria cv. 'Napoli'. *Plantflor Cultivo & Comercio*, 112: 118-121.
- Miralles de Imperial R, Martín JV, Delgado MM, 2009. Influencia de la fertilización con residuos ganaderos en la producción estacional de alstroemeria. *Plantflor Cultivo & Comercio*, 135: 74-76.
- Scotford IM, Cumby TR, White RP, Carton OT, Lorenz F, Hatterman U, Provolo G, 1998. Estimation of the nutrient value of agricultural slurries by measurement of physical and chemical properties. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 71: 291-305.
- Vasconcelos E, Cabral F, Cordovil CMdS, 1997. Effects of solid phase from pig slurry on soil chemical characteristics, nitrate leaching, and yield of wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 20 (7&8): 939-952.
- Yavinder-Singh, Pannu RPS, Bijay-Singh, Khind CS, 2005. Leaching of potassium from organic manures, crop residues and inorganic fertilizer in two soils under flooded and upland moisture regimes. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 53 (2): 207-213.
- (Aceptado para publicación el 19 de enero de 2010)

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

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

Los premios se regirán de acuerdo a las siguientes

BASES

1. Podrán concursar todos los artículos que versen sobre cualquier tema técnico-económico-agrario.
2. Los artículos que podrán acceder al premio serán todos aquellos que se publiquen en ITEA en el año 2009. Consecuentemente, los originales deberán ser enviados de acuerdo con las normas de ITEA y aprobados por su Comité de Redacción.
3. El jurado estará constituido por las siguientes personas:
 - a) Presidente de AIDA, que presidirá el jurado.
 - b) Director de la revista ITEA, que actuará de Secretario.
 - c) Director Gerente del CITA (Diputación General de Aragón).
 - d) Director del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.
 - e) Director de la Estación Experimental de Aula Dei.
4. El premio será anual y tendrá una dotación económica.
5. Las deliberaciones del jurado serán secretas, y su fallo inapelable.
6. El fallo del jurado se dará a conocer en la revista ITEA, y la entrega del premio se realizará con motivo de la celebración de las Jornadas de Estudio de AIDA.



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

CIHEAM/IAMZ - Cursos 2009-10-11

CIHEAM

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
PRODUCCIÓN VEGETAL	* OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA	25 Sep. 09/26 Mayo 10	Córdoba	UCO/IA/CSIC/COI/INIA/IAMZ
	SALINIDAD DE SUELOS EN LOS SISTEMAS AGRARIOS: IMPACTO Y GESTIÓN	26-31 Oct. 09	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto Qualiwater
	ALIMENTOS FUNCIONALES: BASES CIENTÍFICAS Y OPORTUNIDADES PARA EL SECTOR AGROALIMENTARIO	15-19 Feb. 10	Zaragoza	IAMZ/Proyecto Consolider Fun-C-Food
	APLICACIONES DE LA BIOINFORMÁTICA EN MEJORA VEGETAL	12-16 Abr. 10	Zaragoza	IAMZ
	* MEJORA GENÉTICA VEGETAL	4 Oct. 10/10 Jun. 11	Zaragoza	IAMZ/UdL
PRODUCCIÓN ANIMAL	* NUTRICIÓN ANIMAL	5 Oct. 09/11 Jun. 10	Zaragoza	IAMZ/UZ/FEDNA/UPM
	* MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	5 Oct. 09/30 Jun. 10	Valencia/Barcelona	UPV/UAB/IAMZ/IVIA/INIA/IRTA/AGROALIMED
	PRODUCCIÓN CAPRINA	8-19 Nov. 10	Murcia	IAMZ/CAA-CARM
	CONSERVACIÓN Y GESTIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMALES	17-21 Ene. 11	Zaragoza	IAMZ/FAO
	APLICACIONES DE LA GENÓMICA EN MEJORA ANIMAL	21-25 Mar. 11	León	IAMZ/Univ. León
	PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN CLIMAS CÁLIDOS	9-13 Mayo 11	Zaragoza	IAMZ

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

- MEJORA GENÉTICA VEGETAL: 10-11; 12-13; 14-15
- OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA: 09-10; 11-12; 13-14
- NUTRICIÓN ANIMAL: 09-10; 11-12; 13-14
- MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN: 09-10; 11-12; 13-14
- PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE: 10-11; 12-13; 14-15
- MARKETING AGROALIMENTARIO: 09-10; 11-12; 13-14
- ACUICULTURA: 10-11; 12-13; 14-15

Se destinan primordialmente a titulados superiores en vías de especialización de posgrado. No obstante se estructuran en unidades independientes para facilitar la asistencia de profesionales interesados en aspectos parciales del programa. Los participantes que cumplan los requisitos académicos pueden optar a la realización del 2º año para la obtención del Título Master of Science. El plazo de inscripción para los cursos de Mejora genética vegetal, Planificación integrada para el desarrollo rural y la gestión del medio ambiente y Acuicultura finaliza el 4 de Mayo 2010. El plazo de inscripción para el curso de Olivicultura y elaiotecnica finaliza el 15 de Abril 2011. El plazo de inscripción para los cursos de Nutrición animal, Mejora genética animal y biotecnología de la reproducción y Marketing agroalimentario finaliza el 3 de Mayo 2011.

El Estado Español reconoce el título Master of Science del CIHEAM otorgado a través del IAMZ como equivalente al título oficial de Máster del sistema universitario español.

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

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

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

	CURSOS	FECHAS	LUGAR	ORGANIZACIÓN
MEDIO AMBIENTE	EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA DESERTIFICACIÓN Y DE LA VULNERABILIDAD DE LOS SISTEMAS DE USO DEL SUELO	28 Sep./3 Oct. 09	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto DeSurvey
	PREDICCIÓN DE LA DESERTIFICACIÓN A MEDIO PLAZO	18-23 Ene. 10	Zaragoza	IAMZ/UE-Proyecto DeSurvey
	ACUÍFEROS COSTEROS PARA RIEGO Y ABASTECIMIENTO: USO SOSTENIBLE Y ACTUACIONES DE REMEDIACIÓN	22-27 Mar. 10	Zaragoza	IAMZ
	GESTIÓN ADAPTATIVA DE LOS ECOSISTEMAS FORESTALES MEDITERRÁNEOS AL CAMBIO CLIMÁTICO	10-15 Mayo 10	Zaragoza	IAMZ
	* PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE	4 Oct. 10/10 Jun. 11	Zaragoza	IAMZ/UdL
	ECONOMÍA AMBIENTAL Y DE LOS RECURSOS NATURALES	7-18 Feb. 11	Zaragoza	IAMZ
COMERCIALIZACIÓN	* MARKETING AGROALIMENTARIO	5 Oct. 09/11 Jun. 10	Zaragoza	IAMZ
	MARKETING DE PRODUCTOS ECOLÓGICOS	18-22 Oct. 10	Zaragoza	IAMZ
	INCORPORACIÓN DE LA CALIDAD Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA EN LOS PLANES DE MARKETING	4-8 Abr. 11	Zaragoza	IAMZ
	ESTRATEGIAS DE MARKETING PARA LOS PRODUCTORES AGRARIOS LOCALES	13-17 Jun. 11	Zaragoza	IAMZ
PESCA Y AGRICULTURA	ESTABLECIMIENTO Y GESTIÓN DE ÁREAS MARINAS PROTEGIDAS DE INTERÉS PESQUERO	8-13 Mar. 10	Zaragoza	IAMZ/MARM-SGM
	NUEVAS PERSPECTIVAS PARA LAS CADENAS DE COMERCIALIZACIÓN EN PESCA ARTESANAL Y ACUICULTURA A PEQUEÑA ESCALA	26-30 Abr. 10	Zaragoza	IAMZ/FAO/MARM-FROM
	MEJORAS TECNOLÓGICAS EN ARTES DE PESCA PARA UNA GESTIÓN SOSTENIBLE	14-18 Jun. 10	Zaragoza	IAMZ
	* ACUICULTURA	18 Oct. 10/31 Mayo 11	Las Palmas de Gran Canaria	ULPGC/ICCM/IAMZ
	GESTIÓN DE LA SEGURIDAD EN MOLUSCOS BIVALVOS	27 Sep./1 Oct. 10	Santiago de Compostela	IAMZ/Univ. Santiago de Compostela/FAO
	CULTIVO DE ALGAS MARINAS: TÉCNICAS, USOS Y PERSPECTIVAS DE DESARROLLO	22-26 Nov. 10	Zaragoza	IAMZ
	HERRAMIENTAS PARA EL SEGUIMIENTO Y VIGILANCIA EN LOS SISTEMAS DE CONTROL DE LA PESCA	14-18 Mar. 11	Zaragoza	IAMZ
	MONITORIZACIÓN DE LOS EFECTOS AMBIENTALES DE LA ACUICULTURA	23-27 Mayo 11	Murcia	IAMZ/CAA-CARM

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

Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza

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

INSCRIPCIÓN EN AIDA

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

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

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

CUOTA ANUAL: Firma.

ITEA 40 €

FORMA DE PAGO:

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

□□□□□□□□□□□□□□□□

Fecha de caducidad: /

SR. DIRECTOR DE.....

Muy Sr. mío:

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

Atentamente,

Firmado:

BANCO O CAJA DE AHORROS:

SUCURSAL:

DIRECCIÓN CALLE/PLAZA: N.º

CÓDIGO POSTAL:

POBLACIÓN:

